

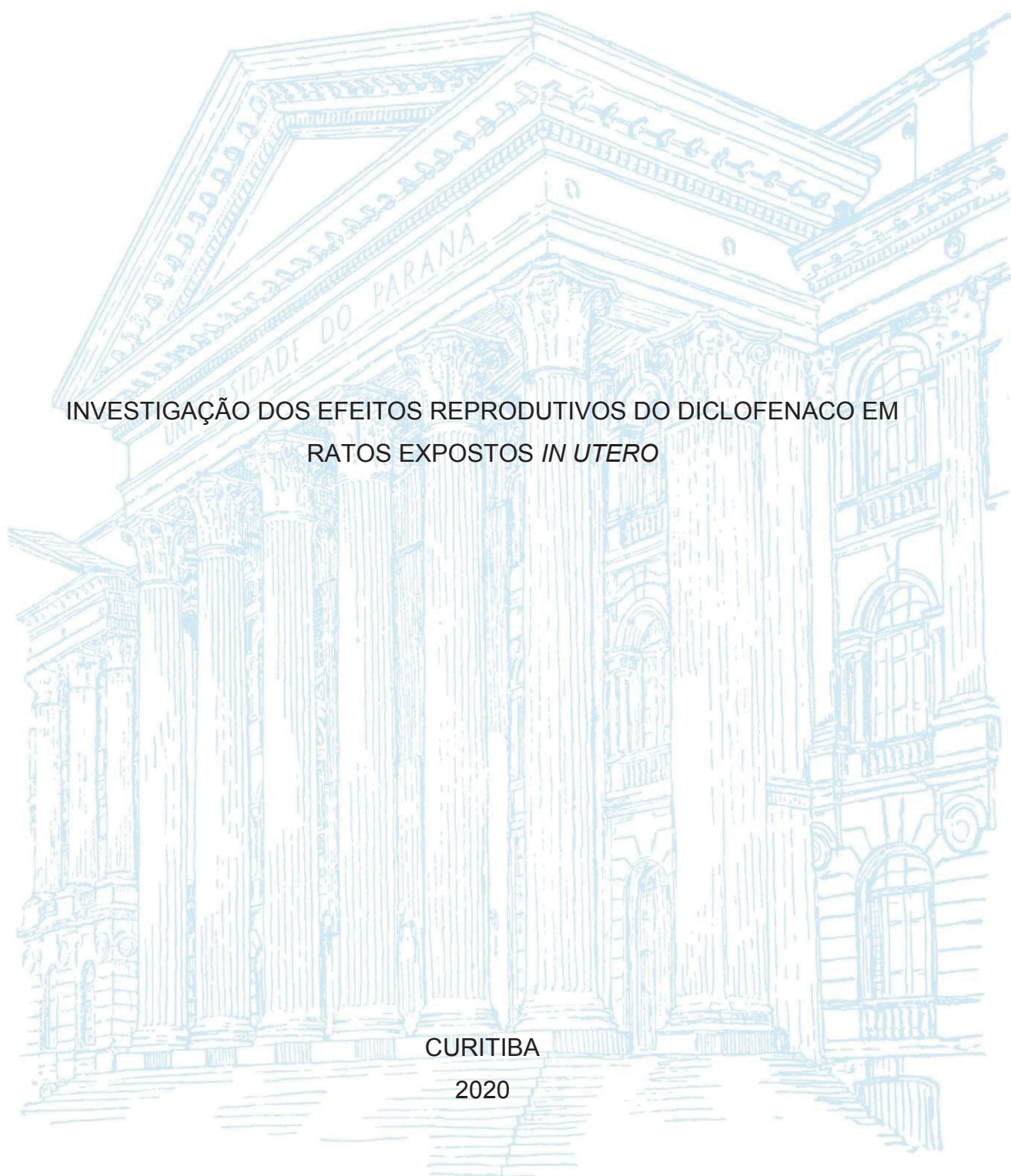
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE CRISTINE KREBS RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS REPRODUTIVOS DO DICLOFENACO EM  
RATOS EXPOSTOS *IN UTERO*

CURITIBA

2020



DANIELE CRISTINE KREBS RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS REPRODUTIVOS DO DICLOFENACO EM  
RATOS EXPOSTOS *IN UTERO*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração Toxicologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino  
Andrade

CURITIBA  
2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribeiro, Daniele Cristine Krebs

Investigação dos efeitos reprodutivos do diclofenaco em ratos expostos  
*in utero*. / Daniele Cristine Krebs Ribeiro. – Curitiba, 2020.  
93 p.: il.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Analgésicos. 2. Diclofenaco. 3. Reprodução - Toxicidade. 4. Sistema  
endócrino. I. Título II. Andrade, Anderson Joel Martino, 1977-. III. IV.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.783



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DANIELE CRISTINE KREBS RIBEIRO** intitulada: **Investigação dos efeitos reprodutivos do diclofenaco em ratos expostos *in utero***, sob orientação do Prof. Dr. ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

30/04/2020 16:40:10.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/05/2020 10:00:32.0

SABRINA LOISE DE MORAIS CALADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/05/2020 19:46:25.0

JOAO LUIZ COELHO RIBAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: [pgfarmacologia@ufpr.br](mailto:pgfarmacologia@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 40425

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 40425

## **NOTA EXPLICATIVA**

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, bem como conclusão. O artigo foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico “Reproductive Toxicology” ao qual foi submetido em Março de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por estar sempre comigo onde quer que seja trilhado meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade, pelos ensinamentos, ajuda e paciência. Admiro muito o seu trabalho e foi uma honra poder ter sido sua aluna durante o mestrado. Obrigada por ter me dado essa oportunidade!

Aos professores Dra. Izonete Guiloski, Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, Dr. João Luiz Coelho Ribas e Dra. Sabrina Calado por aceitarem participar das bancas de qualificação e defesa e pelas contribuições.

Aos professores Dra. Ariany Carvalho dos Santos, Dr. Roosevelt Isaias Carvalho Souza e Dra. Katherine Maria Spercoski, pela parceria e contribuições para esse trabalho.

Às amigas que o laboratório de Toxicologia Reprodutiva me proporcionou, Marcella, Tatiana, Sara e Gabriela. A ajuda e incentivo de vocês foi essencial! Obrigada por tornarem meus dias melhores. Que nós estejamos sempre unidas, como sempre foi!

Às alunas de iniciação científica, que também se tornaram minhas amigas, Nicole, Giovanna e Heloísa. Obrigada por toda ajuda! Tenho certeza que vocês serão excelentes profissionais, independente da área que escolherem.

Ao meu namorado Leandro, por me dar todo amor e incentivo durante esse período e por me apoiar nos dias mais difíceis.

Aos meus pais Anne Lize e Antonio, que me deram a melhor vida que eu poderia ter. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida e a razão por mais essa conquista. Obrigada por me darem tanto amor e apoio, em todos os momentos.

A toda minha família e amigos que estiveram sempre comigo, mesmo que distantes. Obrigada por cada palavra, sorriso e sentimentos bons que compartilham comigo.

A todos os membros do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais, que mesmo sem poder escolher, dão sua vida para que possamos contribuir para a ciência.

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho!

## RESUMO

Os analgésicos estão entre os medicamentos mais utilizados em todo o mundo e foram recentemente associados a efeitos antiandrogênicos. Devido à alta prevalência de uso de analgésicos durante a gestação, existe uma preocupação com os possíveis riscos associados à exposição pré-natal a esses medicamentos. Estudos demonstraram a associação do uso de analgésicos de uso comum, como o paracetamol, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno, com efeitos desreguladores endócrinos em animais e humanos (efeitos antiandrogênicos decorrentes da inibição da produção de testosterona pelo testículo fetal, por exemplo). O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroide amplamente utilizado pela população e que é encontrado no ambiente. Embora contraindicado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres podem usar esse medicamento durante esse período. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos reprodutivos em ratos machos e fêmeas expostos *in utero* ao diclofenaco do dia gestacional 10 ao 20. Ratas prenhes foram tratadas com diclofenaco nas doses de 0,2, 1 e 5 mg/kg/dia por via oral. Os marcadores do desenvolvimento sexual avaliados na prole foram a distância anogenital (AGD) e número de mamilos em machos e fêmeas, separação prepucial (PPS) em machos e abertura do canal vaginal (VO) e primeiro estro (FE) em fêmeas. Foram avaliados o peso de órgãos reprodutivos de todos os descendentes e, na prole masculina, a produção espermática diária, quantificação plasmática de testosterona e histologia testicular. Não foram observados efeitos significativos na AGD e desenvolvimento de mamilos da prole feminina e masculina em qualquer dose de diclofenaco testada. As idades médias de VO, FE e PPS foram maiores em todos os grupos de tratamento, mas alcançaram significância estatística apenas na PPS nos machos expostos *in utero* a 0,2 mg/kg/dia de diclofenaco. Não foram observadas alterações nos pesos dos órgãos reprodutivos masculinos ou femininos nem nos demais parâmetros avaliados na prole masculina (contagem espermática, quantificação plasmática de testosterona e histologia dos testículos). No geral, os resultados indicam que a exposição intrauterina ao diclofenaco não induz alterações nos marcadores externos de desregulação endócrina ou fisiologia reprodutiva, mas pode ter um impacto nos marcos de desenvolvimento associados ao início da puberdade.

**Palavras-chave:** Desreguladores endócrinos. Toxicidade Reprodutiva. Analgésicos. Diclofenaco



## ABSTRACT

Mild analgesics are among the most used drugs worldwide and have been recently associated with antiandrogenic effects. Due the high prevalence of analgesic use during pregnancy, there is a concern about the possible risks associated with prenatal exposure to these drugs. Studies have shown an association between the use of commonly used analgesics, such as paracetamol, acetylsalicylic acid and ibuprofen, with endocrine disrupting effects in animals and humans (antiandrogenic effects resulting from the inhibition of testosterone production by the fetal testis, for example). Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug widely used by the population and is found in the environment. Although contraindicated during pregnancy, it is known that many women can use this drug during this period. Thus, the aim of the study was to investigate the reproductive effects in male and female rats exposed *in utero* to diclofenac from gestational day (GD) 10 to 20. Pregnant rats were treated with diclofenac at doses of 0.2, 1 and 5 mg/kg/day via gavage. The markers of sexual development evaluated in the offspring were the anogenital distance (AGD) and nipple development in males and females, preputial separation (PPS) in males and vaginal opening (VO) and first estrus (FE) in females. The weight of the reproductive organs of all offspring was evaluated and, in the male offspring, daily sperm production, plasma testosterone quantification and testicular histology. No significant effects were observed in AGD and nipple development of female and male offspring at any diclofenac dose tested. The mean ages of VO, FE and PPS were higher in all treated groups, but reached statistical significance only in PPS in males exposed *in utero* to 0.2 mg/kg/day of diclofenac. There were no changes in the weights of the male or female reproductive organs or in the other parameters evaluated in the male offspring (daily sperm production, plasma testosterone quantification and histology of the testis). Overall, the results indicate that intrauterine exposure to diclofenac does not induce changes in external markers of endocrine disruption or reproductive physiology, but may have an impact on the developmental markers associated with the onset of puberty.

**Key-words:** Endocrine disruptors. Reproductive Toxicity. Analgesics. Diclofenac.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DICLOFENACO.....	26
--	----

## ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 – EFFECTS OF <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO DICLOFENAC OR DEHP (MG/KG/DAY) ON FEMALE OFFSPRING VAGINAL OPENING AND FIRST ESTRUS.....	45
--	----

FIGURE 2 – EFFECTS OF <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO DICLOFENAC OR DEHP (MG/KG/DAY) ON PREPUTIAL SEPARATION OF MALE OFFSPRING RATS .....	46
---	----

FIGURE 3 – PHOTOMICROGRAPHS OF REPRESENTATIVE TESTICULAR SECTIONS FROM CONTOL RAT, RATS EXPOSED TO DICLOFENAC AT 0.2 MG/KG/DAY, 1 MG/KG/DAY AND 5 MG/KG/DAY, AND RAT EXPOSED TO DEHP 750 MG/KG/DAY .....	49
--	----

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 – BODY WEIGHT DEVELOPMENT OF RAT OFFSPRING IN THE WEANING PERIOD FOLLOWING IN UTERO EXPOSURE TO 0.2, 1 OR 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC (D) AND 750 MG/KG/DAY OF DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP) .....	59
--	----

SUPPLEMENTARY FIGURE 2 – BODY WEIGHT DEVELOPMENT OF FEMALE OFFSPRING IN THE POST-WEANING PERIOD FOLLOWING IN UTERO EXPOSURE TO 0.2, 1 OR 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC (D), AND 750 MG/KG/DAY OF DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP) .....	59
---	----

SUPPLEMENTARY FIGURE 3 – BODY WEIGHT DEVELOPMENT OF MALE OFFSPRING IN THE POST-WEANING PERIOD FOLLOWING IN UTERO EXPOSURE TO 0.2, 1 OR 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC (D), AND 750 MG/KG/DAY OF DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP) .....	60
---	----

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE 1 – PREGNANCY AND LACTATION OUTCOMES FOLLOWING MATERNAL EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC FROM GD10 TO GD20.....	41
TABLE 2 – DEVELOPMENTAL LANDMARKS OUTCOMES FOLLOWING MATERNAL EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC FROM GD10 TO GD20.....	43
TABLE 3 – REPRODUCTIVE PARAMETERS IN ADULT FEMALE AND MALE RATS FOLLOWING <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC .....	48
SUPPLEMENTARY TABLE 1 – RELATIVE WEIGHT (%) OF REPRODUCTIVE ORGANS OF ADULT FEMALE AND MALE RATS FOLLOWING <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC.....	56
SUPPLEMENTARY TABLE 2 – RELATIVE WEIGHT (%) OF NON-REPRODUCTIVE ORGANS OF ADULT FEMALE AND MALE RATS FOLLOWING <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC.....	57
SUPPLEMENTARY TABLE 3 – ABSOLUTE WEIGHT (%) OF ORGANS OF ADULT FEMALE AND MALE RATS FOLLOWING <i>IN UTERO</i> EXPOSURE TO 0.2, 1 AND 5 MG/KG/DAY OF DICLOFENAC (D).....	58

## LISTA DE SIGLAS

2,2'-Azino-bis	- 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
4'-OHD	- 4'-hidroxi diclofenaco
4'-OHDD	- 4'-hidroxi diclofenaco desidrato
5-OHD	- 5-hidroxi diclofenaco
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
AMH	- Anti-Müllerian hormone
AGD	- Anogenital distance
AGI	- Anogenital index
ANOVA	- Analysis of Variance
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	- Chemical Abstracts Service
CAT	- Catalase
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	- Ciclooxigenase
DDT	- dicloro-difenil-tricloroetano
DEHP	- Di(2-etilhexil)ftalato
DES	- Dietilestilbestrol
EMA	- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EUA	- Estados Unidos da América
FE	- First estrus
GD	- Gestational day
GnRH	- hormônio liberador gonadotrofina
HE	- Hematoxylin and eosin
HPG	- Eixo gonadal hipotalâmico-hipofisário
INSL-3	- Fator semelhante à insulina-3
IPCS	- International Programme on Chemical Safety
LABC	- Levator ani muscle/Bulbocavernosus muscle
NOAEL	- No Observed Adverse Effect Level
NSAIDs	- Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PND	- Post natal day

PPS	- Preputial separation
SD	- Standard deviation
SEM	- Standard error of mean
SOD	- Superóxido desmutase
TDS	- Síndrome de disgenesia testicular
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
US EPA	- United States Environmental Protection Agency
VO	- Vaginal opening
WHO	- World Health Organization

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg/L	- microgramas por litro
µM	- micromolar
D	- diclofenaco
e.g.	- por exemplo
g	- gramas
kg	- quilogramas
mg	- miligramas
mL	- mililitros
ng	- nanogramas
mg/L	- miligramas por litro
ng/L	- nanogramas por litro
h	- horas

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual

® - marca registrada

± - mais ou menos

°C - graus Celcius

= - igual

p - nível de significância

≤ - menor ou igual

n - tamanho da amostra

< - menor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	17
2.2	ANALGÉSICOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	20
2.3	ANALGÉSICOS NA GESTAÇÃO.....	22
2.4	DICLOFENACO.....	25
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>31</b>
5.1	INTRODUCTION.....	33
5.2	MATERIAL AND METHODS.....	35
5.2.1	Animals.....	35
5.2.2	Selection of diclofenac doses and treatment.....	35
5.2.3	Offspring data.....	37
5.2.4	Euthanasia and sample collection.....	37
5.2.5	Daily sperm production.....	38
5.2.6	Testosterone concentration.....	38
5.2.7	Histopathological evaluation of the testis.....	39
5.2.8	Statistical Analysis.....	39
5.3	RESULTS.....	40
5.3.1	Maternal and pregnancy outcomes.....	40
5.3.2	Developmental landmarks.....	42
5.3.2	Reproductive evaluation in adult female and male rats.....	47
5.4	DISCUSSION AND CONCLUSION.....	50
5.5	SUPPLEMENTARY DATA.....	56
5.6	REFERENCES.....	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO ESTENDIDA E CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com poluentes presentes no meio ambiente tem aumentado nos últimos anos. Substâncias como metais pesados, agrotóxicos e fármacos vêm sendo cada vez mais investigadas devido aos efeitos adversos que podem causar em seres humanos e animais, que, muitas vezes, ocorrem por uma exposição a doses ambientalmente relevantes. Recentemente, tem havido especial atenção com as substâncias capazes de desregular o sistema endócrino, que são capazes de causar alterações sobre a reprodução e desenvolvimento, por exemplo.

Inúmeros compostos químicos presentes em produtos de higiene pessoal e de utilização doméstica e industrial possuem atividade desreguladora endócrina comprovada. São substâncias como pesticidas, ftalatos, bifenilas policlorinadas (PCBs), bisfenol-A (BPA) e algumas classes de medicamentos, como analgésicos e anti-inflamatórios (ROSS et al, 1995; SATHYANARAYANA et al., 2008; FONTENELE et al., 2010; CHRISTIANSEN et al., 2014; KRISTENSEN et al., 2016).

Diferentes significados são propostos para o termo “desreguladores endócrinos”. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, essas substâncias são definidas como “agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (US.EPA, 1997).

Muitos estudos epidemiológicos ou de vida selvagem não possuem medidas exatas de exposição aos desreguladores endócrinos, o que dificulta a capacidade de tirar conclusões definitivas a respeito dessas substâncias. Isso está relacionado principalmente aos compostos que são rapidamente degradados no meio ambiente ou no corpo humano. A exposição que poderia ter causado um efeito adverso (por exemplo, um déficit reprodutivo) não é detectável no momento em que as manifestações clínicas se tornam evidentes. Por essa razão, a maioria dos estudos delineados para examinar as relações causa e efeito envolvem desreguladores endócrinos biologicamente e ecologicamente persistentes (WHO-IPCS, 2002).

Grande parte das substâncias químicas disponíveis no mercado não é testada adequadamente quanto aos seus efeitos no sistema endócrino. Porém, a exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer em períodos importantes do desenvolvimento humano e de animais, desde a fertilização até o desenvolvimento

fetal e a amamentação, o que suscita uma preocupação especial.

Recentemente, muitos estudos têm indicado que medicamentos de uso comum, como alguns analgésicos e anti-inflamatórios, apresentam atividade desreguladora endócrina (KRISTENSEN et al., 2011a; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; BEN MAAMAR et al., 2017). Esses dados são preocupantes, uma vez que a exposição a medicamentos pode ocorrer de forma não intencional, por meio da ingestão de resíduos presentes em alimentos ou na água, mas também de maneira intencional pelo uso farmacológico. Com isso, mais estudos tornam-se necessários para que seja possível reduzir a exposição à essas substâncias e prevenir a ocorrência de efeitos adversos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS**

Nas últimas décadas tem havido uma crescente preocupação científica, debate público e atenção da mídia sobre os possíveis efeitos deletérios nos seres humanos e na vida selvagem que podem resultar da exposição a produtos químicos com o potencial de interferir no sistema endócrino. Os chamados desreguladores endócrinos abrangem uma variedade de classes químicas, incluindo hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, compostos utilizados na indústria de plásticos, produtos de consumo e outros subprodutos e poluentes industriais. Eles são frequentemente difundidos e amplamente dispersos no ambiente. Alguns são persistentes, podendo ser transportados por longas distâncias e já foram encontrados em praticamente todas as regiões do mundo. Outros são rapidamente degradados no ambiente ou no corpo humano, ou podem estar presentes apenas por curtos períodos. Contudo, ainda que não sejam persistentes em organismos vivos, a exposição contínua pode ocorrer em razão da presença ubíqua de alguns agentes químicos no meio ambiente. Além disso, exposições em períodos críticos do desenvolvimento podem ocasionar efeitos graves e muitas vezes irreversíveis, ainda que a exposição ocorra apenas por curtos períodos.

Os desreguladores endócrinos apresentam o potencial de alterar a regulação hormonal e as funções normais do sistema endócrino, afetando consequentemente a saúde e a reprodução em animais e seres humanos (CASALS-CASAS E

DESVERGNE, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, essas substâncias são definidas como “substâncias exógenas ou misturas de substâncias que alteram a função do sistema endócrino e que consequentemente podem causar efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, sua progênie ou subpopulações, interferindo na atividade hormonal normal” (WHO-IPCS, 2002).

A maior parte da atenção atualmente voltada para as substâncias químicas com potencial efeito desregulador endócrino está sendo direcionada às possíveis alterações sobre o desenvolvimento da prole exposta *in utero* ou durante o período perinatal, pois essas são fases bastante críticas para a ação hormonal (SAWAKI et al., 2003; PAGÉ-LARIVIÈRE et al., 2016). A exposição a substâncias tóxicas no desenvolvimento fetal e durante a lactação pode resultar em alterações permanentes que não são vistas em adultos expostos a níveis semelhantes (GRANDE et al., 2006; HANNON E FLAWS, 2015).

Estudos demonstraram que o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um pesticida muito utilizado antigamente, possui atividade estrogênica e pode alterar funções reprodutivas de mamíferos e pássaros (US.EPA, 1997). Outros exemplos relacionados ao DDT também foram relatados, como malformações detectadas no sistema reprodutivo de jacarés em lagos da Flórida contaminados com a substância (GUILLETTE et al., 1996, BILA E DEZOTI, 2007). Além disso, pesticidas menos solúveis, como o DDT, quando chegam aos ambientes aquáticos, podem aderir à sedimentos e, consequentemente, persistir nessas vias por anos (DI et al., 2019). Embora o DDT tenha sido banido nos EUA e em muitos outros países ao redor do mundo no início dos anos 70, o DDT e seus metabólitos ainda têm sido detectados em fontes de água potável em todo o mundo (DI et al., 2017; TADEVOSYAN et al., 2019). No Brasil, sua comercialização para qualquer fim foi proibida apenas em 2009 (VASCONCELLOS et al., 2019).

O bisfenol A (BPA, 4,4'-isopropilidenodifenol) é outro exemplo de desregulador endócrino amplamente utilizado para fabricar produtos plásticos, incluindo revestimentos de alimentos e garrafas plásticas. Vários estudos epidemiológicos relataram ampla exposição de populações humanas, incluindo crianças, que podem ser particularmente expostas por meio de mamadeiras e produtos plásticos infantis (YE et al., 2006; CALAFAT et al., 2008; WHO-IPCS, 2012; ROCHESTER et al., 2017). Ainda na década de 90, pesquisadores demonstraram que a exposição ao Bisfenol A foi capaz de reduzir a produção espermática e causar

alterações prostáticas em ratos, mesmo em baixas concentrações, relevantes para a situação de exposição humana (VOM SAAL et al., 1998). Em fêmeas, sabe-se que a exposição ao BPA causa desenvolvimento e morfologia alterados das glândulas mamárias. A exposição *in utero* ao BPA resultou em desenvolvimento alterado, aumento do volume epitelial e morfologia ductal alterada das glândulas mamárias em camundongos (HINDMAN et al., 2017). Contudo, até 2011 essa substância esteve presente na composição de mamadeiras e outros produtos infantis, apesar de existirem evidências de toxicidade em diversos países, incluindo o Brasil (ANVISA, 2011; EC, 2011).

Além do DDT e BPA, produtos farmacêuticos também têm sido associados à efeitos desreguladores endócrinos. O estrogênio sintético dietilestilbestrol (DES), utilizado em gestantes entre as décadas de 50 e 70 para evitar abortos e partos prematuros, é o exemplo mais bem documentado de um desregulador endócrino com efeitos em humanos. As filhas de mulheres que utilizaram esse medicamento tiveram maior probabilidade de apresentar distúrbios reprodutivos, como gravidez anormal, aborto espontâneo, anormalidades uterinas e cervicais e câncer vaginal (HERBST 1976; HERBST et al., 1971; BIRKETT et al., 2003). Os homens expostos *in utero* ao DES também apresentaram alterações, como anormalidades no trato urogenital (criptorquidismo e hipospádia), redução na qualidade espermática e câncer testicular (DEPUE et al., 1983; GILL et al., 1977; SWAN, 2000).

Em cada caso, concentrações detectáveis de compostos com efeitos desreguladores endócrinos têm sido encontradas nos animais ou em seu habitat, mas uma ligação etiológica foi estabelecida apenas para algumas dessas observações. Em estudos ecológicos esses efeitos não foram reconhecidos até as populações começarem a diminuir. Contudo, a observação de que a população está estável não garante que os desreguladores endócrinos não estejam afetando a reprodução, desenvolvimento e crescimento dos indivíduos (TOPPARI et al., 1996; RICHARDSON E TERNES, 2017; GODFRAY et al., 2019).

Apesar do conhecimento limitado sobre a associação entre alterações em seres humanos e exposições a desreguladores endócrinos, estudos sugerem que muitas doenças em adultos têm origens fetais, mas as causas ainda são de difícil explicação. Alguns distúrbios reprodutivos, especialmente em homens adultos, estão fortemente associados a distúrbios congênitos, como criptorquidismo e hipospádia (FERNANDEZ et al., 2007; RODPRASERT et al., 2019) Esses distúrbios, juntamente

com o câncer testicular e a qualidade deficiente do sêmen, formam a síndrome de disgenesia testicular (TDS). Alterações na funcionalidade de células somáticas essenciais para a produção hormonal e o desenvolvimento testicular durante o período intrauterino, como as células de Leydig e de Sertoli fetais, prejudicam o desenvolvimento reprodutivo masculino, o que implica em efeitos que se manifestam ao nascimento ou tardiamente. Acredita-se que alterações hormonais durante o período intrauterino, juntamente com fatores genéticos e ambientais sejam as causas da TDS, e que a deficiência androgênica seja um fator crucial no aparecimento dos distúrbios que compõem essa síndrome (SKAKKEBAEK et al., 2001; WHO-IPCS, 2012; HU et al., 2018; MA et al., 2020; NADER E BOYER, 2020). Dados experimentais com ratos indicam que a deficiência androgênica durante uma janela pré-natal crítica para a masculinização, do dia gestacional (GD) 15 a 18 (correspondendo ao período de 8 a 14 semanas de gestação em humanos) leva a distúrbios muito similares aos observados na TDS humana, incluindo criptorquidismo, hipospádia, comprometimento da fertilidade e redução da distância anogenital (WELSH et al., 2008).

Os compostos que atuam como desreguladores endócrinos incluem estrógenos exógenos, substâncias antiandrogênicas e agentes que atuam em outros componentes do sistema endócrino como as glândulas tireoide e pituitária (TOPPARI et al., 1996). Além de seus efeitos no sistema reprodutivo, há evidências de que os desreguladores endócrinos possam causar alterações nos níveis de neuroesteroides e, portanto, têm o potencial de afetar funções imunológicas, comportamentais e de memória (WARING e HARRIS, 2005; CSABA, 2019; NESAN et al., 2019; WENG et al., 2020).

É possível que existam níveis suficientemente altos de desreguladores endócrinos no meio ambiente para exercerem efeitos adversos na população em geral, mas o fato de muitas vezes serem efeitos de manifestação tardia dificulta o estabelecimento de uma relação de causa e efeito. Com isso, estudos experimentais com modelos animais tornam-se necessários para a identificação e avaliação de substâncias capazes de perturbar o sistema endócrino, principalmente durante períodos críticos do desenvolvimento.

## 2.2 ANALGÉSICOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais, são medicamentos

classicamente utilizados para o tratamento da dor, febre, mal-estar e condições inflamatórias (KRISTENSEN et al., 2016). O mecanismo farmacológico de ação desses medicamentos está ligado principalmente à sua capacidade de reduzir a produção de prostanoídes a partir do ácido araquidônico por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que é constituída por duas isoformas principais: a COX-1 (constitucional ou fisiológica) e a COX-2 (induzida ou inflamatória) (JÚNIOR et al., 2007).

Em um estudo recente realizado no Brasil, os autores analisam o uso de analgésicos pela população brasileira através de dados coletados por meio da Pesquisa Nacional sobre Acesso, Uso e Promoção do Uso Racional de Medicamentos (PIZZOL et al., 2019). Os analgésicos não opioides foram os agentes mais utilizados (18,5%), seguidos pelos anti-inflamatórios não esteroidais (6,9%) e analgésicos opioides (0,5%). Nesses percentuais, os autores incluíram uso ocasional ou contínuo de analgésicos, independentemente da origem (por prescrição ou automedicação). Os medicamentos mais utilizados foram dipirona (37,8% de todos os analgésicos), paracetamol (25,3%) e diclofenaco (10,7%). Esses medicamentos foram utilizados principalmente para condições de saúde ocasionais, principalmente a dor. Em termos de número de prescrições, os analgésicos não opióides foram a segunda categoria terapêutica mais prescrita em 2016, apenas atrás dos tratamentos para hipertensão arterial sistêmica. É importante enfatizar que o estudo demonstrou que a prevalência do uso sem prescrição é maior do que o uso sob prescrição.

Apesar da evidência mais forte de desregulação endócrina em humanos estar ligada a um produto farmacêutico, o DES, apenas recentemente os pesquisadores voltaram suas atenções para a possibilidade de efeitos desreguladores endócrinos pela exposição à medicamentos de uso comum, como os analgésicos e AINEs. Estudos sugerem que os analgésicos podem ter propriedades desreguladoras endócrinas capazes de alterar a função reprodutiva humana e animal em diferentes fases da vida e em ambos os sexos. (KRISTENSEN et al., 2011a, 2012; SINJER et al., 2012; BRUNE et al., 2014; ROBERTS et al., 2016; SABIR et al., 2018). Na década de 1980, estudos demonstraram a relação entre a exposição pré-natal à analgésicos de uso comum e a redução da masculinização em animais (GUPTA e GOLDMAN, 1986; GUPTA, 1989).

Há evidências de que o paracetamol, um analgésico de uso comum entre a população, interfere no desenvolvimento reprodutivo masculino. Vários estudos

associaram a exposição intrauterina a esse fármaco com criptorquidismo e outras malformações reprodutivas congênitas (JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011a; LIND et al., 2013; SNIJDER et al., 2012; PEREIRA et al., 2020), que são fatores de risco conhecidos para problemas tardios de fertilidade e câncer testicular (SKAKKEBAEK et al., 2001).

Em um estudo publicado por Mazaud-Guittot et al. (2013), a exposição *in vitro* de testículos fetais humanos ao paracetamol reduziu os níveis do fator semelhante à insulina-3 (INSL-3) (hormônio produzido pelas células de Leydig fetais, envolvido nos processos de descida do testículo ao escroto). Além disso, os autores sugerem que essa inibição poderia ser o mecanismo pelo qual alguns desses medicamentos aumentam o risco de criptorquidismo (MAZAUD-GUITTROT et al., 2013). O ibuprofeno, um anti-inflamatório muito utilizado entre as mulheres durante a gestação (por automedicação), já foi associado à redução dos níveis de testosterona em fragmentos de testículos fetais humanos, obtidos durante o primeiro e segundo trimestres de gestação, quando cultivados *ex vivo* na presença de doses terapêuticas do fármaco. Além disso, o ibuprofeno também foi capaz de reduzir a produção do INSL-3 (BEN MAAMAR et al., 2017).

Em relação ao trato reprodutor feminino, o ácido acetilsalicílico e a indometacina já foram associados a efeitos deletérios na ovulação em ratos e coelhos (SIROIS et al., 2004). Estudos com mulheres na pré menopausa já sugeriram que a utilização de paracetamol está negativamente correlacionado com os níveis de testosterona livre (BAUER et al., 2013) e positivamente com o metabolismo do estrogênio (FORTNER et al., 2014). Além disso, um relato de caso indicou que o diclofenaco, o naproxeno e a indometacina alteraram a menstruação em mulheres adultas, levando à hipomenorreia ou amenorreia (MEYBOOM et al., 1995).

Embora todos esses estudos não possam ser diretamente traduzidos em recomendações para o uso de analgésicos e anti-inflamatórios em humanos, fornecem apoio experimental à associação epidemiológica e ao desenvolvimento de distúrbios relacionados ao sistema endócrino, evidência que apoiaria a prevenção do uso desses medicamentos, principalmente durante o início da gestação.

### 2.3 ANALGÉSICOS NA GESTAÇÃO

As mulheres geralmente são aconselhadas a evitar a utilização de



medicamentos durante a gestação. Contudo, o desconforto musculoesquelético e outros sintomas, mesmo que temporários, são muito frequentes entre as gestantes e, com isso, a maioria utiliza um ou mais analgésicos, como paracetamol, ou AINEs, em algum momento desse período (WERLER et al., 2005; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2011). Porém, esses medicamentos devem ser administrados com cautela, principalmente durante o primeiro trimestre de gestação, que é um período onde ocorrem processos cruciais para o desenvolvimento fetal.

Alguns medicamentos utilizados durante a gestação não têm segurança comprovada ou são conhecidos por afetar adversamente o desenvolvimento fetal. Além disso, o perfil de segurança de alguns medicamentos pode mudar de acordo com a idade gestacional. Com isso, o tratamento farmacológico em mulheres gestantes deve manter um equilíbrio entre o risco-benefício tanto para a mãe quanto para a criança (BLACK E HILL, 2003; KAWAGUCHI et al., 2019; YAMADA et al., 2020). Estudos demonstram que o paracetamol, por exemplo, é capaz de atravessar a placenta e, portanto, tem o potencial de causar efeitos diretos no feto (WIEGAND et al., 1984; MA et al., 1989; NITSCHKE et al., 2017). Não é ético testar diretamente os efeitos dos analgésicos em gestantes e, portanto, a evidência de associações entre o uso de analgésicos durante a gestação e o desenvolvimento de distúrbios reprodutivos nos descendentes deriva de uma combinação de estudos epidemiológicos e experimentais realizados nos últimos anos.

Um estudo de revisão de trabalhos realizados entre 1989 e 2010, demonstrou que os estudos publicados sobre utilização de medicamentos revelam ampla variação nas estimativas do uso na gestação (27-93% das gestantes que utilizaram medicamentos prescritos pelo menos uma vez, excluindo vitaminas e minerais). Entre estudos semelhantes, as estimativas foram mais baixas nos países do norte da Europa (44-47%) e mais altas na França (93%) e na Alemanha (85%). As taxas médias de uso de medicamentos contraindicados na gestação variaram de 0,9% (Dinamarca, 1991-1996) a 4,6% (EUA, 1996-2000). O uso de medicamentos com evidência positiva de risco variou de 2,0% (Itália, 2004) a 59,3% (França, 1996) (DAW et al., 2011). Além disso, de acordo com um estudo feito na Austrália, mais de 85% das mulheres utilizam algum medicamento durante a gestação, sendo que os analgésicos são os mais comumente utilizados (depois das vitaminas), com mais de 50% das mulheres utilizando esses medicamentos durante esse período (HENRY E CROWTHER, 2000).



Um estudo dinamarquês (n=46500) relatou o uso de analgésico em 55% das gestantes (JENSEN et al., 2010), enquanto um estudo realizado nos EUA (n=10533) relatou que 65% das mulheres utilizavam paracetamol durante o período gestacional (15% em combinação com ibuprofeno) (WERLER et al., 2005). Um estudo francês de menor porte (n=895) relatou uma frequência ainda maior de uso de analgésicos (81%) em gestantes (PHILIPPAT et al., 2011). Além disso, o consumo geral de analgésicos aumentou significativamente na maioria dos países europeus entre 1997 e 2017 (KRISTENSEN et al., 2016).

Os anti-inflamatórios não esteroidais são medicamentos que normalmente estão disponíveis sem receita médica. Relata-se que a prevalência de uso dentro do intervalo de pré-concepção até o primeiro trimestre varia de 2,9% a 18% (GLOVER et al., 2003; BAKKER et al., 2008; WERLER et al., 2005). Em um estudo brasileiro sobre a prevalência do uso de medicamentos na gestação, os analgésicos estavam entre os seis medicamentos mais utilizados entre as 1000 gestantes entrevistadas. Dentre os analgésicos mais utilizados estavam a dipirona (41,8%), o paracetamol (20,9%), ácido acetilsalicílico (20,9%) e dipirona em combinação com adifenina e prometazina (11,9%). Os analgésicos também representaram 37,6% dos medicamentos utilizados por automedicação (FONSECA et al., 2002).

Outra publicação, com um total de 1091 gestantes participantes, demonstrou que 84,7% fizeram uso de algum medicamento durante a gestação, e, dentre eles, os analgésicos corresponderam a 21,8%. O paracetamol foi o analgésico mais prevalente com 21,3%, seguido da dipirona com 7,7% (COSTA et al., 2017). Em um grande estudo multinacional (Europa, Américas do Norte e do Sul e Austrália) realizado entre 2011 e 2012, 81% das gestantes utilizaram medicamentos e os analgésicos foram a classe mais comum entre os fármacos, utilizados por 56% das mulheres (38% no primeiro trimestre, 44% no segundo trimestre e 36% no terceiro trimestre) (LUPATTELLI, 2014).

O uso de analgésicos durante a gestação está associado a uma série de efeitos adversos, incluindo o aumento do risco de aborto espontâneo no início da gestação e alterações na fisiologia da gravidez e do feto durante o último trimestre. Além disso, a inibição sistêmica da síntese de prostaglandinas, causada por medicamentos dessa classe, durante o terceiro trimestre, pode levar à constrição do canal arterial fetal (causando hipertensão pulmonar nos recém-nascidos), redução do fluxo sanguíneo renal (que pode resultar na diminuição da produção de líquido

amniótico - oligoidrânio) e retardo no trabalho de parto. Outro efeito associado à utilização desses fármacos, mais relacionado ao uso de ácido acetilsalicílico, é o aumento do risco de hemorragia durante o trabalho de parto, devido a inibição irreversível da enzima COX e consequente inibição da ativação plaquetária (RATHMELL et al., 1997).

Além da automedicação, existe a exposição indireta que ocorre por meio do contato com a água e alimentos contaminados com resíduos desses medicamentos. A presença de fármacos e seus resíduos no meio ambiente não ocorre apenas diretamente, por meio da excreção de pacientes ou atividades industriais, mas também por meio do descarte inadequado ou do tratamento ineficiente de águas residuais (COURTIER et al., 2019). Quando os fármacos e seus metabólitos ativos e inativos chegam nas estações de tratamento de esgoto, podem não ser totalmente eliminados, e assim permanecerem nos efluentes dessas estações ou podem chegar às águas superficiais, subterrâneas e até mesmo na água potável (BUERGE et al., 2006; VERPLANCK et al., 2005; FERNÁNDEZ et al., 2014). Em um estudo em estações de tratamento de esgotos e efluentes na Alemanha, 20 diferentes fármacos e 4 metabólitos correspondentes, incluindo anti-inflamatórios (ácido salicílico, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, fenazona), reguladores de lípidios (bezafibrato, gemfibrozil, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico), betabloqueadores (metoprolol, propranolol) e carbamazepina foram detectados em ambientes aquáticos (KOLPIN et al., 2002).

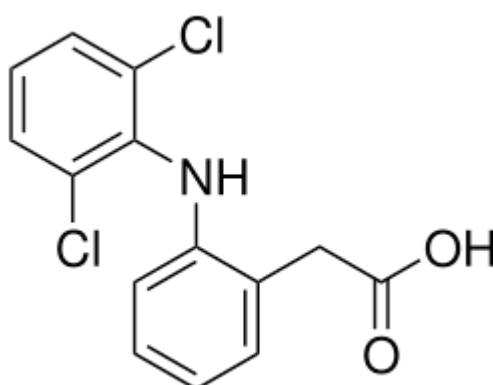
Em razão dessa exposição simultânea, pela utilização dos medicamentos e pelo contato por meio de corpos d'água e alimentos contaminados, torna-se importante ter conhecimento dos potenciais efeitos desreguladores endócrinos dessas substâncias, que, algumas vezes, podem ocorrer mesmo em baixas doses e afetar o sistema reprodutivo de humanos e animais.

## 2.4 DICLOFENACO

O diclofenaco (Figura 1) (ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), derivado do ácido fenilacético, que apresenta propriedades analgésicas e antitérmicas. Essas propriedades terapêuticas são decorrentes da inibição da produção de prostaglandinas que ocorre por meio da inibição da enzima COX. Diferentemente da ação da maioria dos AINEs, esse fármaco

inibe a enzima COX-2 com maior potência do que a COX-1. O diclofenaco é comercializado como Voltaren® (diclofenaco sódico) ou como Cataflam® (diclofenaco potássico) e pode ser utilizado em casos de lesões, dor e inflamação no pós-operatório, em períodos menstruais, infecções de ouvido nariz ou garganta, artrite ou outros tipos de reumatismo, crises de gota e cólica biliar e renal (ANVISA, 2016).

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DICLOFENACO



FONTE: GROSSER; SMYTH; FITZGERALD (2012).

Desde sua introdução na indústria farmacêutica, em 1973, várias formas farmacêuticas contendo diclofenaco foram desenvolvidas com a finalidade de melhorar a eficácia, seu perfil de tolerância e a conveniência dos pacientes que o utilizam. O desenvolvimento de formulações tópicas, para o tratamento da dor local e inflamação, por exemplo, permitiu a diminuição da sua absorção sistêmica. Além disso, há diferentes formulações e preparações farmacêuticas, como comprimidos de liberação imediata, cápsulas em gel e formulações em pó para solução oral, que podem alterar a taxa de absorção e/ou a duração da ação do diclofenaco (ALTMAN et al., 2015).

Quando administrado oralmente, a absorção do diclofenaco é geralmente rápida e dependente da dose, composição farmacêutica e tempo de administração em relação à ingestão de alimentos. Aproximadamente 60% do diclofenaco intacto chega até a circulação sistêmica depois de passar pelo metabolismo de primeira passagem. Cerca de 65% é excretado pela urina e 35% pela bile, sendo eliminado sob a forma de glicuronídeo e conjugados de sulfato (RIESS et al., 1978; TODD E SORKIN, 1988; DAVIES et al., 1997).

Além de se concentrar na circulação sistêmica, o diclofenaco acumula-se em tecidos inflamados, o que reduz sua ligação a proteínas plasmáticas devido ao ambiente ácido fraco. Com isso, ocorre o aumento da fração livre do fármaco, facilitando sua difusão para os espaços intercelulares e possibilitando a execução de seu efeito terapêutico. O diclofenaco também pode se acumular no líquido sinovial em níveis que eventualmente excedem os níveis plasmáticos e que podem persistir após esses terem diminuído significativamente (FOWLER et al., 1983; FOWLER et al., 1986; SEPPALA et al., 1985; BRUNE et al., 2004; BRUNE et al., 2007; BRUNE et al., 2010).

Devido à sua curta meia-vida (aproximadamente 2h) e rápida taxa de eliminação (entre 1,2 e 1,8 h), a administração frequente de diclofenaco torna-se necessária para manter sua concentração terapêutica, o que poderia aumentar o risco de efeitos adversos. Apesar da meia-vida relativamente curta, a concentração plasmática máxima de diclofenaco é maior que a necessária para inibir a COX-2 em 80%, indicando que a eficácia pode ser alcançada em doses mais baixas (TODD E SORKIN, 1988; WARNER et al., 1999).

O diclofenaco é amplamente utilizado em todo o mundo e existem diferentes precauções internacionais sobre esse fármaco, especialmente com referência aos seus efeitos cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticos. No Brasil, ele está entre os 12 medicamentos mais utilizados por automedicação, com uma prevalência de 3,5% quando isolado e de 3,6% quando associado ao paracetamol, cafeína e carisoprodol (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2014; ARRAIS et al., 2016).

O uso de diclofenaco durante o primeiro trimestre da gestação não é associado ao aparecimento de malformações congênitas, mas a substância mostrou atravessar a barreira placentária, podendo ser transferido da mãe para feto em ratos e humanos durante o primeiro trimestre da gestação (SIU et al. 2000, SIU e LEE 2004, GEVREK et al. 2015; SCHERNECK et al., 2015).

Em um estudo sobre os efeitos da sua exposição pré-natal no testículo de ratos recém-nascidos, houve uma redução significativa do número total de células de Sertoli e de espermatogônias nas duas maiores doses testadas, o que sugere que a administração pré-natal de diclofenaco pode causar efeitos deletérios no desenvolvimento dos testículos, especialmente em doses mais altas (ARSLAN et al., 2016).

Em um estudo publicado por Scherneck et al. (2015), foram relatados dois casos de oligoidrânio no segundo trimestre de gestação após o tratamento materno prolongado com diclofenaco. Após a descontinuação do tratamento, os volumes de líquidos amnióticos foram normalizados em poucos dias. Isso sugere que o diclofenaco foi a principal causa dessa alteração. Essa condição já foi associada ao fármaco em outros estudos bem como o fechamento prematuro do ducto arterial e comprometimento da função renal (que também resulta em oligoidrânio). Esses efeitos adversos são característicos do uso de anti-inflamatórios na gestação e resultam da inibição da síntese de prostaglandinas (ANTONUCCI et al., 2012). Outro estudo demonstrou um aumento do risco de aborto após a exposição ao diclofenaco administrado com misoprostol durante a gravidez. Das 166 mulheres expostas aos medicamentos no início da gestação, 28,3% abortaram espontaneamente em comparação com 10,6% das não expostas (ANDERSEN et al., 2016).

Além da exposição por meio da utilização farmacológica, que resulta nas alterações citadas acima, também existe a possibilidade de ocorrer uma exposição indireta, através de alimentos contaminados e da água, principalmente. Uma das principais preocupações ambientais tornou-se a ocorrência e o destino farmacêutico no meio aquático (HEBERER et al., 2002; LEE et al., 2005; FENT et al., 2006). O diclofenaco é um dos AINEs mais frequentemente utilizados, com altas taxas de concentração e detecção ambiental. Em ambientes aquáticos, as concentrações globais de diclofenaco variam de ng/L a µg/L (ANDREOZZI et al., 2003; LONAPPAN et al., 2016). Em um estudo em estações de tratamento na Alemanha, os metabólitos do diclofenaco 4'-hidroxi diclofenaco (4'-OHD), 5-hidroxi diclofenaco (5-OHD) e 4'-hidroxi diclofenaco desidrato (4'-OHDD) foram detectados nas seis estações avaliadas em concentrações até 1,7 µg/L, 0,86 µg/L e 0,66 µg/L, respectivamente, indicando que não apenas o diclofenaco, mas também seus metabólitos, estão sendo encontrados globalmente no meio aquático (STÜLTEN et al., 2008). Além disso, o diclofenaco também tem sido detectado em ambientes aquáticos no Brasil (LOPES et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; AMÉRICO-PINHEIRO et al., 2017). Em um estudo realizado em Pernambuco, foi feita a análise da presença de diclofenaco e paracetamol em dois pontos do rio Beberibe. O diclofenaco foi detectado em todas as amostras coletadas, em concentrações que variaram entre 0.019 e 0.193 mg/L (VERAS et al., 2019).

De acordo com a ANVISA (2016), o uso do diclofenaco não é recomendado

nos dois primeiros trimestres de gestação, pois não existem dados suficientes sobre sua utilização durante esse período. Além disso, seu uso no terceiro trimestre, assim como o de outros anti-inflamatórios não esteroidais, não é recomendado em razão dos riscos de fechamento prematuro do ducto arterial, oligoidrâmnio e comprometimento da função renal do feto. Contudo, assim como ocorre com outros analgésicos, muitas mulheres podem utilizar esse fármaco sem prescrição médica em diferentes períodos da gestação, inclusive no início, quando ainda há o desconhecimento do estado gestacional. Com isso, mais estudos acerca dos efeitos do diclofenaco sobre parâmetros reprodutivos e nos desfechos sensíveis ao sistema endócrino tornam-se necessários.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição a desreguladores endócrinos pode trazer efeitos adversos para a vida humana e animal, e que essa exposição é ainda mais relevante no período pré-natal, quando ocorrem eventos biológicos cruciais para o desenvolvimento dos organismos, levando a importantes distúrbios reprodutivos.

Os analgésicos estão entre os fármacos mais utilizados entre a população, e estudos sugerem que esses medicamentos podem atuar como desreguladores endócrinos, alterando a função reprodutiva humana e animal em diferentes fases da vida, tanto em machos quanto em fêmeas. Sabe-se que a utilização de analgésicos ocorre inclusive durante o período gestacional e, com isso, seus possíveis riscos relacionados à exposição pré-natal tornam-se preocupantes (BRUNE et al., 2014; ROBERTS et al., 2016; SABIR et al., 2018).

O diclofenaco é um anti-inflamatório que também é muito utilizado e, no Brasil, já esteve entre os 12 medicamentos mais utilizados por automedicação (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2014; ARRAIS et al., 2016). Além disso, recentemente um estudo demonstrou que o diclofenaco foi o terceiro medicamento mais utilizado dentre a população brasileira, considerando o uso por prescrição ou por automedicação (PIZZOL et al., 2019). Mesmo sendo contraindicado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres podem utilizar esse medicamento durante esse período. Porém, o diclofenaco ainda não foi testado de forma adequada quanto aos seus efeitos sobre parâmetros reprodutivos, e, até então, não existem

estudos avaliando parâmetros como distância anogenital e marcadores associados ao início da puberdade, por exemplo, após a exposição *in utero* a esse medicamento. Com isso, torna-se importante a investigação de sua possível atuação como desregulador endócrino e consequentes riscos à saúde reprodutiva humana e animal.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos reprodutivos do diclofenaco em ratos machos e fêmeas expostos *in utero* entre os dias 10 e 20 de gestação.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do protocolo de tratamento sobre a gestação e viabilidade dos filhotes.
- Investigar marcadores externos de desregulação endócrina na prole exposta *in utero*: distância anogenital e número de mamilos em machos e fêmeas.
- Avaliar marcadores do início da puberdade: separação prepucial em machos e abertura do canal vaginal e primeiro estro em fêmeas.
- Examinar o impacto da exposição prenatal ao diclofenaco sobre parâmetros reprodutivos na idade adulta, incluindo o peso dos órgãos reprodutivos em machos e fêmeas e produção espermática, quantificação de testosterona plasmática e histologia testicular em machos.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Investigation of reproductive effects of diclofenac in rats exposed *in utero***

Daniele Cristine Krebs Ribeiro<sup>1\*</sup>, Marcella Tapias Passoni<sup>1\*</sup>, Heloísa Meldola<sup>1</sup>, Tatiana Zauer Curi<sup>1</sup>, Gabriela Neubert da Silva<sup>1</sup>, Sara Emilia Lima Tolouei<sup>1</sup>, Giovanna Sari Hey<sup>1</sup>, Nicole Grechi<sup>1</sup>, Ariany Carvalho dos Santos<sup>2</sup>, Roosevelt Isaias Carvalho Souza<sup>2</sup>, Katherinne Maria Spircoski<sup>3</sup>, Anderson Tadeu de Araujo Ramos<sup>4</sup>, Anderson Joel Martino-Andrade<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Reproductive Toxicology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

<sup>2</sup>Department of Health Sciences, Histopathology Laboratory, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biosciences, Federal University of Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brazil

<sup>4</sup>Department of Physiology, Animal Endocrine and Reproductive Physiology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Anderson Joel Martino Andrade

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico – Jardim das Américas, ZIP 81531-980, Curitiba – PR, PO Box 19031, Brazil.

Phone: + 55 41 3361-1719

E-mail: anderson.andrade@ufpr.br



## Abstract

Mild analgesics and anti-inflammatory drugs are among the most used pharmaceuticals worldwide and have been recently associated with antiandrogenic and other endocrine disrupting effects. Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug widely used by the general population and it is also found in the environment. Although contraindicated during pregnancy, it is known that many women can use this drug during this period. This study investigated reproductive effects in male and female rats following *in utero* exposure to diclofenac from gestational day (GD) 10 to 20. Pregnant rats were treated with diclofenac at doses of 0.2, 1 and 5 mg/kg/day via gavage. Anogenital distance (AGD) and the number of nipples were evaluated in the offspring. Developmental landmarks of puberty onset - vaginal opening (VO), first estrus (FE) and preputial separation (PPS) – and reproductive parameters at adulthood were also investigated. No significant effects were observed in AGD and number of nipples in both female and male offspring at any diclofenac doses tested. The mean ages at VO and FE were higher in all treatment groups, but no significant differences were observed in pairwise comparisons. A significant delay in PPS was observed in males exposed *in utero* to diclofenac 0.2 mg/kg/day. No changes were observed in male or female reproductive parameters assessed at adulthood. Overall, our results indicate that *in utero* diclofenac exposure induces no change in biomarkers of endocrine disruption or reproductive physiology at adulthood, but may have an impact in developmental landmarks associated with the onset of puberty.

Keywords: Diclofenac, analgesics, endocrine disruptors, reproductive toxicology

## 5.1 Introduction

Experimental and epidemiological studies indicate that certain male and female reproductive disorders may be related to intrauterine exposure to endocrine disruptors. These substances are commonly found in the environment and include pesticides, phthalates, polychlorinated biphenyls (PCBs), bisphenol-A (BPA), organotins, and some classes of pharmaceuticals such as analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Sawaki et al., 2003; Fontanele et al., 2010).

Although the strongest evidence of human endocrine disruption is linked to gestational exposure to a pharmaceutical product, diethylstilbestrol (DES) (Herbst et al., 1971; Herbst 1976; Birkett and Lester, 2003), the possible endocrine disrupting effects of commonly used drugs, such as analgesics and NSAIDs is a recent concern (Kristensen et al., 2011). These drugs are among the most used medicines by the general population worldwide, but also by pregnant and lactating women. Moreover, many mild analgesics and NSAIDs are sold as non-prescription (over-the-counter) drugs (Mckenna and McIntyre, 2006; Rebordosa et al., 2008; Kristensen et al., 2011; Thorpe et al., 2013).

Several *in vitro* and *in vivo* studies indicate that some analgesics and NSAIDs, such as paracetamol, acetylsalicylic acid and indomethacin, may cause endocrine and reproductive disorders through multiple mechanisms, altering fetal testicular development in animals and humans and causing infertility and premature ovarian failure in rats (Kristensen et al., 2012; Snijder et al., 2012; Holm et al., 2016). Intrauterine exposure to these drugs has also been associated with alterations in testicular hormone production, cryptorchidism, malformations in the reproductive tract, and reproductive disorders at adulthood (Kristensen et al., 2011; Van den Driesche et al., 2015; Ben Maamar et al., 2017; Lind et al., 2017). Some of these studies indicate that mild analgesics and NSAIDs may change the production of key fetal testicular hormones, including insulin-like factor 3 (INSL3), a peptide hormone involved in testis descent, and

testosterone (Albert et al., 2013; Mazaud-Guittot et al., 2013).

Diclofenac is a NSAID derived from phenylacetic acid and has analgesic and antipyretic properties. Its therapeutic properties are due to suppression of prostaglandins production through inhibition of the cyclooxygenase enzyme (COX). Diclofenac is used for postoperative injury, pain and inflammation, painful menstrual periods, arthritis or other types of rheumatism, and biliary and renal colic (ANVISA, 2016).

Studies in rats and humans show that diclofenac is capable to cross the placental barrier and can be transferred from mother to fetus in the first trimester (Siu et al. 2000, Siu and Lee 2004, Gevrek et al. 2015; Scherneck et al., 2015). Although data on the effects of diclofenac use during human pregnancy are still scarce, results from a study performed with 145 pregnant women indicate that its use during the first trimester is not associated with congenital malformations (Cassina et al., 2010).

Similarly to other NSAIDs, diclofenac intake is usually not recommended during pregnancy, due to the potential adverse effects, in particular during the third trimester. Use of NSAIDs during mid to late pregnancy is associated with oligohydramnios (decreased production of amniotic fluid), premature closure of the fetal ductus arteriosus, and impaired renal function in the fetus, which are effects related to inhibition of prostaglandin synthesis (Antonucci et al., 2012). In a recent animal study, intrauterine exposure to diclofenac in rats resulted in a significant reduction in the total number of Sertoli cells and spermatogonia in early postnatal testes, suggesting that prenatal administration may cause deleterious effects on testicular development (Arslan et al., 2016). However, the study by Arslan et al. (2006) used high diclofenac doses and intraperitoneal injections, and did not assess endocrine-sensitive endpoints.

Despite being contraindicated during pregnancy, many women might use diclofenac during this period, including women that are not aware of their pregnancy status and those that use

diclofenac through self-medication. However, the effects of diclofenac on reproductive parameters and endocrine-sensitive endpoints are still largely unknown. The aim of this study was to investigate the possible reproductive effects of diclofenac in female and male rats exposed *in utero* to diclofenac between gestation days 10 and 20, a critical window for gonadal and phenotypic sex differentiation (Sharpe 2006).

## 5.2 Material and Methods

### 5.2.1 Animals

Wistar rats were obtained from Federal University of Parana (UFPR), after approval by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) (Consent number 1163). During the experimental period, the animals were maintained under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humidity and light (12-hour light/dark cycle), in polypropylene cages (four animals per cage), receiving food and water *ad libitum*.

Adult female rats (90 days) were mated with adult male rats during the last 3 hours of the dark phase of the light cycle. The day of sperm detection on the vaginal smear was considered as day zero of gestation (GD 0). From a total of 90 rats placed to mate, we obtained 59 pregnant rats that were divided into five experimental groups (n=9-14 pregnant rats per group): negative control group (n=13), diclofenac 0.2 (n=14), diclofenac 1 (n=11), diclofenac 5 (n=12) and positive control group (n=9). The day of births was considered postnatal day 1 (PND 1) and the offspring weaning occurred on PND 21.

### 5.2.2 Selection of diclofenac doses and treatment

Pregnant rats received distilled water (2 ml/kg/day) as negative control, sodium diclofenac at 0.2, 1 and 5 mg/kg/day (CAS 15307-86-5) or di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, CAS 117-81-7) at 750 mg/kg/day as positive control. Diclofenac was obtained from Salvena handling

pharmacy (Curitiba, Brazil), while DEHP was obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). The diclofenac doses were based on human therapeutic use as well as on animal toxicity data. The highest diclofenac dose corresponds to the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) reported for maternal and fetal toxicity in rats (EMEA, 2003) and it is within the human therapeutic dose extrapolated to rats. Two lower doses were selected with a space factor of 5 between doses. For comparison, the maximum recommended human daily dose is 150 mg diclofenac or 2.14 mg/kg/day for a 70 kg adult (ANVISA, 2016). This daily dose corresponds to approximately 9 mg/kg/day for rats following allometric extrapolation with rat body weight set at 0.3 kg and exponent scaling at 0.75 (Nevill, 1994). Diclofenac doses were prepared with distilled water as vehicle. DEHP (positive control) was dissolved in canola oil and administered at 750 mg/kg/day, a dose known to produce antiandrogenic and testicular effects in rats. It has been previously demonstrated that male offspring of rats exposed to high DEHP doses (e.g., 750 mg/kg/day) during gestation or gestation and lactation display reproductive tract abnormalities compatible with disruption of androgen dependent development and impaired testicular function, without causing maternal toxicity. (Gray et al., 2000; Jarfelt et al., 2005; Moore et al., 2001).

All treatments were given from GD10 to GD20, via oral route (gavage), with an administration volume of 2 mL/kg/day. The selected treatment period (GD10-20) included phases of gonadal and phenotypic sexual differentiation. In rats, gonadal differentiation occurs between days 10-15 gestation, while phenotypic differentiation, dependent on androgens and other hormones, occurs in late pregnancy, approximately from day 15 to the end of gestation (Ross and Capel 2005; Sharpe 2006). Maternal weight was recorded daily during the treatment period and weekly until weaning. On PND 22, one day after weaning, all dams were euthanized by sevoflurane inhalation in a closed chamber followed by decapitation. The liver, spleen, kidneys and adrenal glands were removed and weighed, and the uterus was removed to count the number

of implantation sites and to determine post-implantation losses (number of implantation sites - number of live pups/number of implantation sites). Sex ratio, litter size, number of pups born, and pup weights were also recorded. We also calculated the viability and weaning indexes, which correspond, respectively, to the number of live offspring on PNDs 4 and 21 relative to the total number of live offspring at birth.

### 5.2.3 Offspring data

During lactation, the offspring were weighed on PNDs 1, 4, 7, 14 and 21 without distinction between male and female pups, and after weaning the weights were recorded weekly by sex until PND 90. On PND 4, the anogenital distance (AGD) was measured in all pups using a digital caliper from the center of the anus to the base of the genital bud by a single investigator in a blinded manner. Three measurements were taken for each pup and the average was corrected by the cubic root of body weight (anogenital index - AGI) (Gallavan et al., 1999). The pups were also evaluated for the number of nipples on PND 13 by a single investigator. The preputial separation (PPS) was investigated from PND 35 by manual retraction of the prepuce. This procedure was performed daily until all male offspring presented complete separation, with the full exposure of the mature glans penis. The female pups were evaluated daily for vaginal opening (VO), starting on PND 33 until the day of complete opening. Daily vaginal smears were collected after VO until the detection of the first estrus (FE), characterized by the predominance of cornified cells (Grande et al., 2006).

### 5.2.4 Euthanasia and sample collection

Two male and two female rats per litter were euthanized at adulthood (PND 90-110) by sevoflurane inhalation followed by decapitation. Trunk blood was collected for analysis of plasma testosterone concentrations in males. Reproductive organs from male (testes,

epididymides, seminal vesicle without fluid, ventral prostate, levator ani muscle/bulbocavernous muscle (LABC), bulbourethral glands and glans penis) and female rats (uterus and ovaries) were removed and weighed. From each male rat, the right testis was used for daily sperm production and the left one for histopathological evaluation. Also, non-reproductive organs (liver, spleen, kidneys and adrenal glands) were collected from all male and female rats. The relative organ weights were calculated as follows: absolute organ weight  $\times$  100 / body weight.

#### 5.2.5 Daily sperm production

After removal of the tunica albuginea, the right testes were homogenized in 10 mL of saline (0.9% NaCl) containing 0.05% Triton X-100 for 1 minute. The homogenate was diluted ten times in saline for the microscopic count of the number of homogenization-resistant spermatids in a hemocytometer (Bürker, Wertheim, Germany). The number of spermatids per animal was divided by 6.1 (corresponding to the number of days when spermatids in stages 17-19 are present in the seminiferous epithelium) for conversion to daily sperm production (Robb et al., 1978).

#### 5.2.6 Testosterone concentration

Plasma testosterone was quantified by enzyme immunoassay, according to the protocol of Brown et al., 2004. The assay procedure was performed using polyclonal anti-testosterone antibody (R156/7; 1:7500 dilution) and horseradish peroxidase-testosterone conjugate obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA). We used a substrate buffer containing 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and hydrogen peroxide from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Absorbance measurements were performed at 405 nm in a microplate reader (Infinity 200 PRO, TECAN

Life Sciences, Mannedorf, Switzerland). The results were expressed as ng/mL and the assay sensitivity was 0.046 ng/ml. All samples were evaluated in duplicate, and intra and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 15%, respectively.

#### 5.2.7 Histopathological evaluation of the testis

The testes were fixed in modified Davidson's solution (30% of saturated formaldehyde solution, 15% absolute ethanol, 5% glacial acetic acid, 50% distilled water) (Latendresse et al., 2002). After fixation, testes were kept in 70% ethanol, processed, paraffin-embedded, sectioned at 5  $\mu$ m, and stained with hematoxylin and eosin. Testicular sections (n = 8 animals/group) were then examined by a certified veterinary pathologist (A.C.S). Histopathological evaluation consisted of investigating tissue integrity, verifying parameters such as reversible (degeneration) and irreversible cell damage (necrosis and apoptosis), leukocyte inflammatory infiltrate, hemorrhage and fibrosis (Cunha et al., 2009).

#### 2.8 Statistical analysis

Data were tested for normality and homogeneity of variances, and then analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test to compare each treatment group against the control. Alternatively, non-parametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.

For the data on the age at PPS, VO and FE we used one minus Kaplan-Meier survival plot to indicate the cumulative percentage of litters displaying these landmarks at each age. These data were submitted to survival analysis, using the log-rank Mantel-Cox test for overall comparisons between all groups as well as for pairwise comparisons between the control and each treatment group. In the pairwise comparisons of survival curves, we used the Bonferroni correction to adjust the p-value for multiple comparisons. Alternatively, these developmental landmarks



were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test.

In all analyses we used the litter as the statistical unit, i.e. whenever more than one littermate was used we calculated the mean litter values. Statistical significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ) and analyses were performed using GraphPad Prism® version 6.0 software.

## 5.3 Results

### 5.3.1 Maternal and pregnancy outcomes

At the dose levels tested, diclofenac had no significant effects on dams body weight gain during pregnancy, litter size, post-implantation losses or viability and weaning indexes (Table 1). Also, there were no significant differences between groups in pup birth and weaning body weights and sex ratio (Table 1). Likewise, the high DEHP dose group did not change any maternal and early life parameters (Table 1).

**Table 1.** Pregnancy and lactation outcomes following maternal exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac (D) from GD10 to GD20.

Parameters	Experimental Groups				
	Control	D0.2	D1	D5	DEHP
Number of dams	13	14	11	12	9
Body weight gain GD0-20 (g)	93.41 ± 7.84	103.19 ± 5.20	97.85 ± 8.21	89.53 ± 6.06	88.20 ± 4.85
Body weight gain GD10-20 (g)	61.70 ± 5.83	68.11 ± 3.04	63.27 ± 3.21	53.88 ± 5.18	52.24 ± 3.43
Litter size (N)	10.15 ± 0.72	9.21 ± 0.69	10.27 ± 0.43	10.00 ± 0.56	8.00 ± 0.94
Implantation sites (N)	11.92 ± 0.42	11.07 ± 0.71	11.00 ± 0.47	11.25 ± 0.59	10.44 ± 0.44
Post-implantation loss (%)	13.70 ± 6.04	18.91 ± 3.44	6.40 ± 1.96	10.38 ± 3.27	24.39 ± 7.77
Birth weight (g)	6.08 ± 0.11	6.50 ± 0.11	6.46 ± 0.11	6.20 ± 0.22	6.34 ± 0.29
Viability index (%)	100	100	100	100	100
Weaning index (%)	100	100	100	100	100
Weaning body weight (g)	35.62 ± 1.73	38.05 ± 0.92	37.68 ± 1.18	37.55 ± 1.08	38.50 ± 1.45
Sex ratio (male/female)	1.01±0.15	1.28±0.16	1.26 ± 0.36	1.14 ± 0.17	1.91 ± 0.57

Data are shown as litter means ± SEM; ANOVA/ Dunnett. Viability and weaning indexes correspond to the % of live offspring on PNDs 4 and 21, respectively. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day.

### 5.3.2 Developmental landmarks

There were no significant differences across treatment groups for body weight development of rat offspring in the weaning and post-weaning periods (Figures S1, S2 and S3). Data on developmental landmarks, including AGD and AGI, number of nipples, PPS, VO, and FE are shown in Table 2.

There were no significant effects on AGD and AGI in females exposed *in utero* to diclofenac or DEHP. Also, no effects on the number of nipples were observed in the female offspring. The median ages at VO and FE were higher in all treatment groups, but no significant differences were detected (Table 2). Likewise, survival curves of diclofenac and DEHP groups were somewhat shifted to the right, resulting in borderline significances for the overall comparisons (log-rank Mantel-Cox test) of both VO ( $p = 0.078$ ) and FE ( $p = 0.084$ ) (Figure 1). However, no significant differences were seen in pairwise comparisons of survival curves between controls and treated groups. Also, there were no differences in the body weight at the ages of VO or FE (Table 2).

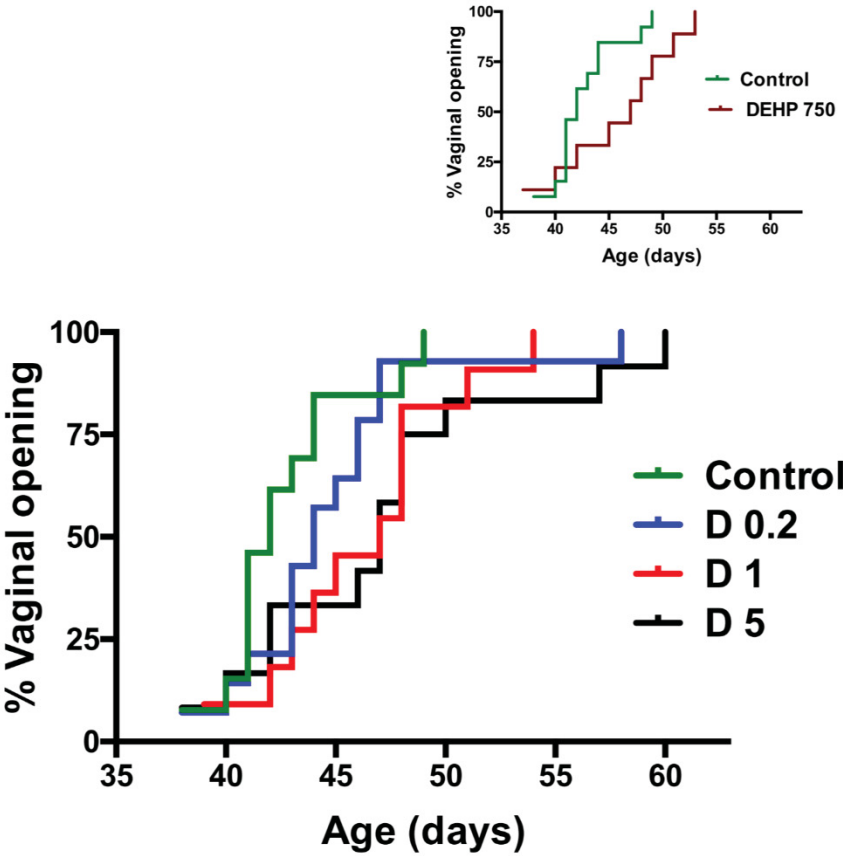
**Table 2.** Developmental landmarks outcomes following maternal exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac (D) from GD10 to GD20.

Experimental Groups					
	Control (n=13)	D0.2 (n=14)	D1 (n=11)	D5 (n=12)	DEHP (n=9)
Female					
AGD	2.001 ± 0.066	2.037 ± 0.066	2.149 ± 0.094	2.058 ± 0.083	2.108 ± 0.106
AGI	0.9738 ± 0.030	0.975 ± 0.030	1.032 ± 0.043	0.995 ± 0.037	1.010 ± 0.60
Nipples	12.25 (12.00, 12.48)	12.31 (12.00, 12.50)	12.50 (12.20, 12.66)	12.25 (12.18, 12.66)	12.33 (12.17, 12.70)
Body weight at VO (g)	125.8 ± 2.204	125.0 ± 2.170	130.7 ± 3.628	132.1 ± 3.120	128.8 ± 3.115
Age at VO	42.00 (41.00, 44.00)	44.00 (42.50, 46.25)	47.00 (43.00, 48.00)	47.00 (42.00, 49.50)	47.00 (41.00, 50.00)
Body weight at FE (g)	125.1 ± 2.544	125.6 ± 4.026	129.4 ± 3.596	128.1 ± 3.886	127.1 ± 6.166
FE	44.00 (43.50, 47.00)	46.00 (44.75, 49.25)	48.50 (44.75, 52.00)	49.50 (44.00, 50.75)	48.00 (43.50, 51.00)
Male					
AGD	4.338 ± 0.087	4.336 ± 0.086	4.541 ± 0.086	4.199 ± 0.059	3.491 ± 0.206****
AGI	2.079 ± 0.036	2.032 ± 0.038	2.148 ± 0.041	2.001 ± 0.022	1.659 ± 0.056****
Nipples	0.000 (0.000, 0.000)	0.140 (0.000, 0.292)	0.330 (0.000, 0.500)	0.070 (0.000, 0.475)	9.000 (5.080, 11.65)****
Body weight at PPS (g)	185.7 ± 4.384	193.4 ± 3.347	182.9 ± 4.195	182.7 ± 4.426	190.5 ± 2.310
PPS	46.00 (45.50, 47.00)	49.00 (47.75, 50.25)**	47.00 (47.00, 49.00)	48.00 (46.25, 50.00)	50.00 (49.00, 50.50)***

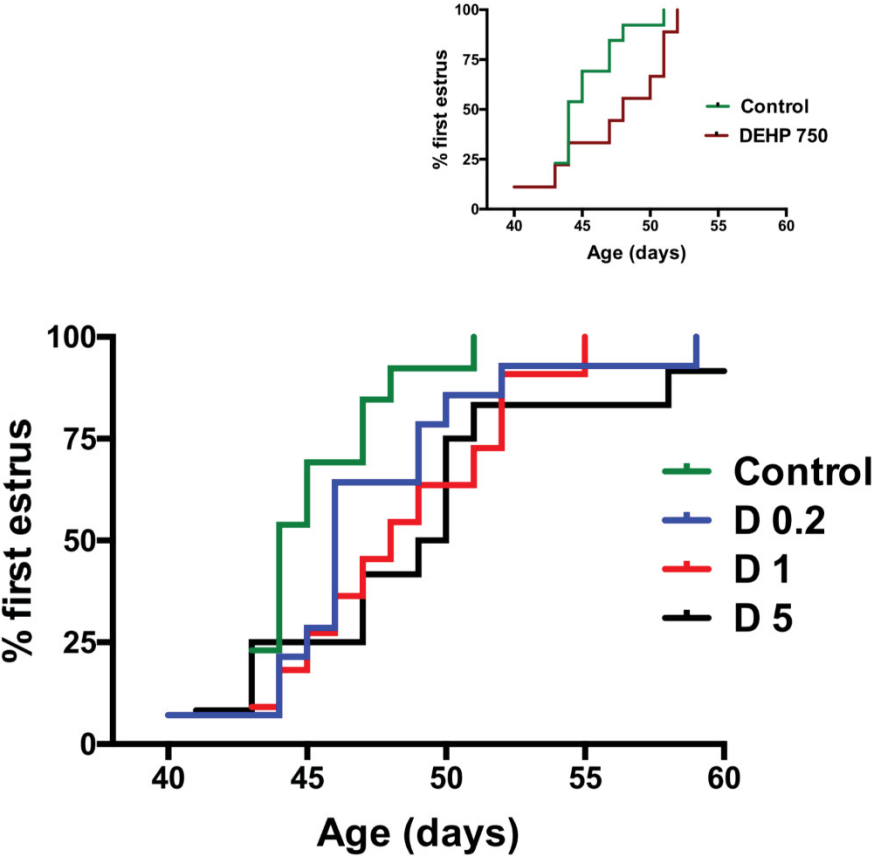
Data on AGD, AGI, and body weight at VO, FE, and PPS were analyzed by ANOVA/Dunnett and are shown as litter means ± SEM. Data on the number of nipples and age at VO, FE, and PPS were analyzed by Kruskal-Wallis/Dunn and are shown as median (Q1, Q3). Significant values are shown in bold: \* ( $p \leq 0.05$ ) \*\* ( $p \leq 0.01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ). VO = Vaginal opening. FE = First Estrus. PPS = Preputial separation. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day. n = number of litters.

No significant differences were seen for AGD, AGI, and nipple retention in male pups treated with diclofenac (Table 2). As expected, a significant reduction in AGD and AGI and an increased number of retained nipples were observed in the positive control group treated with a high DEHP dose. The median age at PPS was higher in all treated groups, but reached statistical significance only in the groups treated with diclofenac 0.2 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day group (Kruskall-Wallis/Dunn). Likewise, the survival curves of treated groups were somewhat shifted to the right ( $p = 0.0002$ ; log-rank Mantel-Cox for overall comparisons), resulting in significant differences for diclofenac 0.2 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day in pairwise comparisons to control group (Figure 2). The body weight at PPS was unaffected in any treatment group.

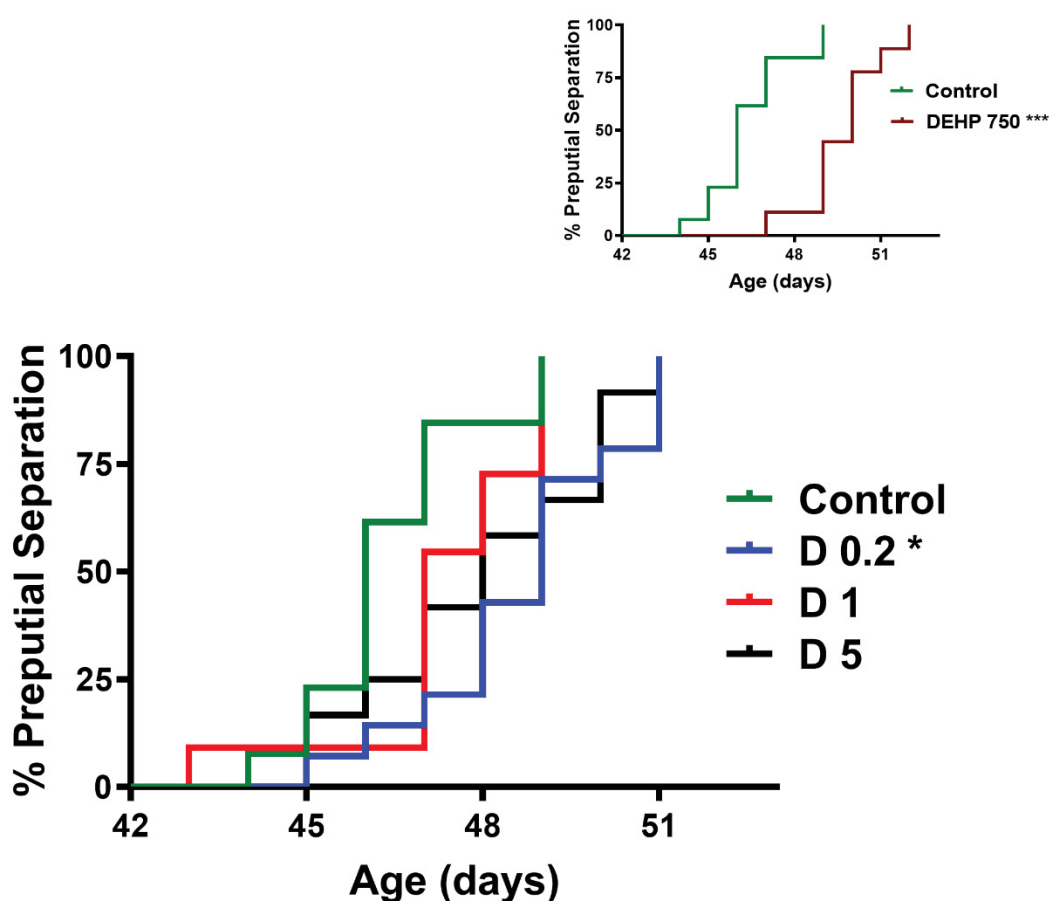
A



B



**Figure 1.** Effects of *in utero* exposure to diclofenac (D) or DEHP (mg/kg/day) on female offspring vaginal opening (A) first estrus (B). Results are expressed as one minus Kaplan-Meier survival plots for the cumulative percentage of litters displaying these landmarks at each age. The survival curves were compared through log-rank Mantel-Cox test. Overall comparison of survival curves yielded borderline significance for vaginal opening ( $p = 0.078$ ) and first estrus ( $p = 0.084$ ), but no significant effects were seen for pairwise comparisons between controls and treated groups. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate. Sample size (litters): Control  $n = 13$ , D0.2  $n = 14$ , D1  $n = 11$ , D5  $n = 12$ , DEHP  $n = 9$ .



**Figure 2.** Effects of *in utero* exposure to diclofenac (D) or DEHP (mg/kg/day) on preputial separation of male offspring rats. Results are expressed as one minus Kaplan-Meier survival plots for the cumulative percentage of litters displaying full preputial separation at each age. The survival curves were compared through log-rank Mantel-Cox test and yielded significant results ( $p = 0.0002$ ). Pairwise comparisons between control and treated groups (log-rank Mantel-Cox test) revealed significant differences for the lowest diclofenac dose (\*  $p < 0.05$ ) and DEHP (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate. Sample size (litters): Control

n = 13, D0.2 n = 14, D1 n = 11, D5 n = 12, DEHP n = 9.

### 5.3.3 Reproductive evaluation in adult female and male rats

There was no significant difference between groups regarding reproductive organ weights of male and female offspring exposed in utero to diclofenac (Table 3 and Table S1). Also, no significant changes were observed in the weights of nonreproductive organs of male and female rats when compared to control group (Tables S2 and S3). On the other hand, in utero exposure to DEHP 750 mg/kg/day resulted in significant reductions in most androgen-dependent organs and tissues, including ventral prostate, seminal vesicle, LABC, and glans penis.

Daily sperm production in diclofenac exposed rats did not differ significantly from the control group. In the histopathological analyses of testes, no changes were observed for the three dose levels of diclofenac. Also, we did not see significant changes in plasma testosterone concentration. Although we did not see changes in the daily sperm production of DEHP exposed rats, severe morphological abnormalities were seen in the histopathological analysis of 3 out of 8 animals, including small (atrophic) seminiferous tubules, vacuolization of the seminiferous epithelium, and severe depletion of germ cells. In some areas, we observed Sertoli-cell only tubules, interstitial fibrosis and discrete inflammatory mononuclear cell infiltration (Figure 3).

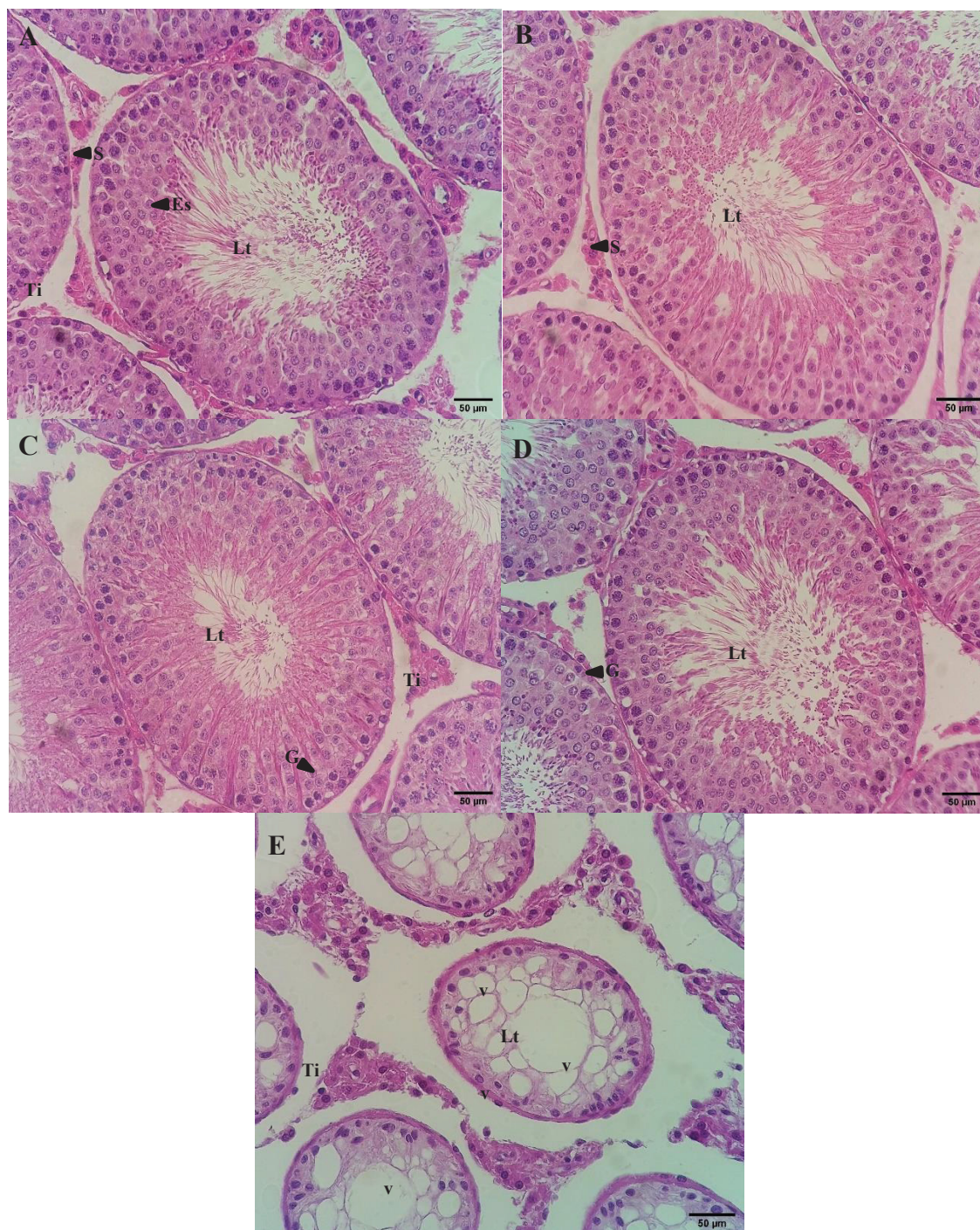


**Table 3.** Reproductive parameters in adult female and male rats following *in utero* exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac (D).

	Experimental Groups				
	Control (n=13)	D0.2 (n=14)	D1 (n=11)	D5 (n=12)	DEHP (n=9)
Female					
Body weight (g)	249 ± 4.039	253 ± 4.669	248 ± 4.043	245 ± 3.159	257 ± 6.134
Ovary	0.061 ± 0.001	0.065 ± 0.002	0.062 ± 0.002	0.067 ± 0.002	0.068 ± 0.03
Uterus	0.502 ± 0.016	0.537 ± 0.028	0.462 ± 0.026	0.491 ± 0.022	0.556 ± 0.033
Male					
Body weight (g)	406 ± 6.722	423 ± 9.003	422 ± 12.25	408 ± 7.089	404 ± 7.089
Testis (g)	1.826 ± 0.027	1.892 ± 0.034	1.833 ± 0.037	1.825 ± 0.033	1.711 ± 0.183
Epididymis (g)	0.538 ± 0.008	0.552 ± 0.010	0.541 ± 0.007	0.525 ± 0.009	0.516 ± 0.011
Ventral prostate	0.322 ± 0.012	0.333 ± 0.016	0.322 ± 0.015	0.305 ± 0.012	<b>0.238 ± 0.030**</b>
Seminal vesicle	0.586 ± 0.010	0.619 ± 0.017	0.620 ± 0.014	0.621 ± 0.022	<b>0.440 ± 0.047***</b>
LABC	1.096 ± 0.019	1.150 ± 0.017	1.180 ± 0.034	1.132 ± 0.024	<b>0.790 ± 0.057****</b>
Bulbourethral glands	0.102 ± 0.004	0.106 ± 0.004	0.108 ± 0.006	0.105 ± 0.006	0.088 ± 0.007
Glans Penis	0.085 ± 0.002	0.088 ± 0.001	0.085 ± 0.002	0.083 ± 0.002	<b>0.071 ± 0.004**</b>
Plasma testosterone levels (ng/ml)	0.653 ± 0.083	0.706 ± 0.102	0.856 ± 0.145	0.835 ± 0.131	0.591 ± 0.086
Daily sperm production	1.21 x 10 <sup>7</sup> ± 4.37	1.18 x 10 <sup>7</sup> ± 3.68	1.26 x 10 <sup>7</sup> ± 3.18	1.18 x 10 <sup>7</sup> ± 3.69	1.19 x 10 <sup>7</sup> ± 5.12

All data are shown as litter means ± SEM. Significant values are shown in bold: \*\* (p ≤ 0.01), \*\*\* (p ≤ 0.001), \*\*\*\* (p ≤ 0.0001); ANOVA/

Dunnett. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day. n = number of litters.



**Figure 3.** Photomicrographs of representative testicular sections from (A) control rat, rats exposed to diclofenac at (B) 0.2 mg/kg/day, (C) 1 mg/kg/day and (D) 5 mg/kg/day (Hematoxylin and eosin - HE, 400 x magnification), and (E) rat exposed to DEHP 750 mg/kg/day (HE, 400 x). In the DEHP exposed rat (E), seminiferous tubules are small with absence of germ cells and vacuolization of Sertoli cells. Tubular lumen (Lt), interstitial tissue

(Ti), spermatogonia (G), spermatids (Es), nucleus of the Sertoli cell (S), vacuolization (v).

#### 5.4 Discussion and conclusion

In this study, gestational exposure of rats to therapeutically relevant doses (0.2, 1 and 5 mg/kg/day) of diclofenac did not induce changes in endpoints typically associated with antiandrogenic activity in the male offspring, such as shortening of AGD, nipple retention, and reductions of androgen dependent organ weights. Daily sperm production, plasma testosterone, and testicular histology of adult male rats exposed *in utero* to diclofenac were unaffected. Also, no effects were observed in the reproductive organ weights of the female offspring. However, *in utero* exposure to diclofenac induced a slight delay in developmental landmarks associated with puberty onset in male and female offspring, although significant results were only seen for PPS at the lowest diclofenac dose. On the other hand, exposure to a high DEHP dose, used as positive control for disruption of sexual development, resulted in a wide spectrum of antiandrogenic effects, as well as a significant delay in the age at PPS in males.

The absence of antiandrogenic effects in animals exposed to diclofenac in the current study contrasts with epidemiological and experimental data reported for other analgesic and anti-inflammatory drugs, such as paracetamol and acetylsalicylic acid (aspirin). Intrauterine exposure to paracetamol (150, 250 and 350 mg/kg/dia) and acetylsalicylic acid (150, 200 and 250 mg/kg/day) from GD 13 to GD 21, reduced AGD in male fetuses in all doses tested (Kristensen et al., 2011). In another study, paracetamol was able to induce nipple retention in male offspring following exposure from GD 13 to GD 20 at a dose of 350 mg/kg/day, although no changes were observed on male AGD (Axelsatd et al., 2014). However, in most cases, the paracetamol effects were observed at doses above those usually seen in the human exposure context, while in our study we used lower, human relevant doses of diclofenac. The masculinization of the reproductive tract is largely dependent on the production of testicular

androgens *in utero*, which also play a role in determining a longer AGD in males and normal size and function of male reproductive organs throughout postnatal life (Sharpe et al., 2006). Prenatal androgenic insufficiency can result in persistent atrophy of androgen dependent organs, despite normal testosterone levels in adulthood, indicating a change in hormonal programming of these tissues (Dean et al., 2016; Curi et al. 2019). Results from *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* model systems indicate that certain analgesics can reduce the production of testosterone and other testicular hormones, such as insulin-like factor 3 (INSL3), a peptide hormone involved in testis descent, by fetal and adult testes in both rodents (Kristensen et al., 2011, 2012; van den Driesche et al., 2015) and humans (Kristensen et al., 2011, 2012; Albert et al., 2013; Mazaud-Guittot et al., 2013; van den Driesche et al., 2015). However, not all analgesics display the same spectrum of reproductive toxicity and there is significant response variability across different studies and model systems (Kristensen et al., 2011, 2012; Dean et al., 2013; Axelstad et al., 2014; Benn Maamar et al., 2017). According to Benn Maamar et al., 2017, each analgesic and NSAID appears to have its own endocrine-disrupting signature. For example, whereas ibuprofen and paracetamol suppress INSL3 production, aspirin does not present this effect. Furthermore, whereas aspirin increases AMH (Anti-Müllerian hormone) production, ibuprofen induces its inhibition, and paracetamol has no effect. *In vitro* exposure of human fetal testis to aspirin and indomethacin resulted in increased testosterone production, while paracetamol induced no effect at all (Mazaud-Guittot et al., 2013). These observations may indicate that there may be differences in the mechanism of endocrine disruption among analgesics, which may also be influenced by dose, duration and timing of exposure in different experimental settings. In this regard, it is interesting to note that the relationship between COX-inhibition and endocrine disrupting effects has not been clearly established and other mechanisms, such as interactions with the endocannabinoid system and direct interference with the expression steroidogenic enzymes, have been suggested to play a role in the endocrine and



reproductive toxicity of certain analgesics (Wilhelm et al., 2005; Jørgensen et al., 2010; Dean et al., 2013; Kristensen et al., 2016; Ben Maamar et al., 2017).

Despite the absence of effects on antiandrogenicity markers, our data indicates that gestational exposure to diclofenac may have an impact on some developmental landmarks associated with the onset of puberty. We observed a delay in the mean age at PPS in male rats exposed to the lowest dose of diclofenac and to DEHP as well. For both PPS and markers of the onset of puberty in females, VO and FE, there was a shift to the right in the developmental curves, suggesting a possible delay in pubertal development. It is noteworthy that these effects occurred without changes in body weight, indicating that the observed effects in pubertal development are not a reflection of a lower overall growth rate.

Unlike other substances, such as phthalates (Salazar et al., 2004; Grande et al., 2006), there are limited studies on the effects of analgesics and NSAIDs on developmental landmarks of puberty onset in rodents. The significance of the reported changes in these endpoints in diclofenac exposed animals and the associated mechanisms are uncertain and should be better evaluated in future developmental toxicity studies. However, considering the complexity of neural networks that govern the onset of puberty and fertility, together with the information on diclofenac neurotoxic effects following prenatal exposures (Yurt and Kaplan, 2018; Motawi et al., 2019) and endocrine disrupting activity in *in vitro* model systems (Cheng et al., 2012; Klopčič et al., 2018), it is possible to hypothesize that the observed delay in pubertal landmarks in this study may be related to an imbalance in the hypothalamic signaling systems that control the onset of puberty. In a recent study by Adeyemi et al. (2019), adult male rats exposed to diclofenac 1 mg/kg/day displayed reduced plasma concentrations of GnRH, increased prolactin concentrations, and reduced enzymatic activities of catalase (CAT) and superoxide desmutase (SOD), suggesting that diclofenac could indirectly promote a dysfunction in GnRH secretion through generation of oxidative stress (Adeyemi et al., 2019), a mechanism that could also

impart the prenatal development of hypothalamic neural networks. Furthermore, we know that the period of *in utero* exposure in our study coincides with part of the period of prenatal development of the hypothalamic structures in rats (GDs 13 – 18), mainly in relation to the number of cells undergoing differentiation (Altman and Bayer, 1978).

In this work, no significant differences were observed in AGD and nipple development of female rats exposed *in utero* at any diclofenac doses tested. There are scarce data demonstrating AGD changes in female rats following prenatal analgesic exposure. Nevertheless, a previous study demonstrated that paracetamol (150 mg/kg/day) and its metabolic precursor aniline (31 and 93 mg/kg/day) decreased this parameter in female offspring after exposure from GD 7 to GD 22 (Holm et al., 2016). Changes in female AGD have been associated with intrauterine rodent exposures to androgenic compounds (Wolf et al., 2002) and to certain estrogenic chemicals, such as bisphenol A and estradiol benzoate (Levy et al., 1995; Kobayashi et al., 2012; Christiansen et al., 2014; Holm et al., 2016). Although sexual differentiation in females is largely hormone-independent, it can still be susceptible to hormonal action induced by intrauterine exposure to endocrine disruptors (Hughes, 2001; Sharpe, 2001; Grande et al., 2006). Overall, our data suggests that, under our experimental conditions, maternal diclofenac exposure does not change genital markers associated with disruption of androgenic or estrogenic signaling in female rat offspring.

Some studies have shown that gestational exposure to mild analgesics can result in long-term alterations in reproductive organs. In this study, no effects were observed on sperm production or histopathology of testes of adult male rats following gestational exposure to diclofenac. There are only limited data in the literature regarding reproductive parameters in postnatal life after *in utero* exposure to diclofenac. Nevertheless, in a study performed by Arslan et al. (2016), intrauterine exposure to diclofenac (GD15-21) altered the histology of male rat testes on PND 7 at the two highest doses tested (9 and 18 mg/kg/day), promoting degeneration of

spermatogonia and Sertoli cells and seminiferous tubule atrophy. However, Arslan and co-workers used higher doses than those used in our study and intraperitoneal administration. In a previous transgenerational study, *in utero* exposure to indomethacin (0.8 mg/kg/day) or paracetamol (350 mg/kg/day), from GD 13.5 to GD 21.5, promoted a significant advancement in testicular germ cells development with early loss of pluripotency-markers in F1 males. However, this reduction was offset in the postnatal period (Dean et al., 2016).

In conclusion, diclofenac was unable to change external markers of endocrine disruption after *in utero* exposure of female and male rats at any dose tested. Also, weights of major male and female reproductive organs were unaffected, and no changes were seen in steroidogenic and gametogenic functions in the male offspring. In contrast to these findings, we report a possible overall delay in developmental landmarks associated with puberty onset, for both males and females. Despite the widespread use of analgesics and NSAIDs by pregnant women, data on the reproductive consequences of developmental exposures to these drugs are still scarce and point out to the need of further epidemiological and experimental studies to comprehensively determine the human risks and the underlying mechanisms of endocrine and reproductive toxicity.

## Acknowledgments

D.C.K.R and A.J.M-A. were scholarship recipients from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil). M.T.P., T.Z.C., G.N.S., and S.E.L.T. were scholarship holders from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil). The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.



5.5 Investigation of reproductive effects of diclofenac in rats exposed *in utero*

Daniele Cristine Krebs Ribeiro, Marcella Tapias Passoni, Heloísa Meldola, Tatiana Zauer Curi, Gabriela Neubert da Silva, Sara Emilia Lima Tolouei, Giovanna Sari Hey, Nicole Grechi, Ariany Carvalho de Souza, Roosevelt Isaias Carvalho Souza, Katherine Maria Spercoski, Anderson Tadeu de Araujo Ramos, Anderson Joel Martino-Andrade

**Supplementary Table 1.** Relative weight (%) of reproductive organs of adult female and male rats following *in utero* exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac.

Experimental Groups					
	Control (n=13)	D0.2 (n=14)	D1 (n=11)	D5 (n=12)	DEHP (n=9)
Female					
Body weight (g)	249 ± 4.039	253 ± 4.669	248 ± 4.043	245 ± 3.159	257 ± 6.134
Ovary	0.024 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.027 ± 0.001	0.026 ± 0.001
Uterus	0.201 ± 0.007	0.212 ± 0.012	0.186 ± 0.011	0.200 ± 0.010	0.217 ± 0.012
Male					
Body weight (g)	406 ± 6.722	423 ± 9.003	422 ± 12.25	408 ± 7.089	404 ± 7.089
Testes	0.451± 0.008	0.449 ± 0.010	0.438 ± 0.017	0.448 ± 0.008	0.425 ± 0.044
Epididymes	0.132 ± 0.002	0.131 ± 0.002	0.128 ± 0.003	0.129 ± 0.003	0.126 ± 0.001
Ventral prostate	0.080 ± 0.003	0.078 ± 0.003	0.075 ± 0.004	0.074 ± 0.003	0.060 ± 0.007*
Seminal vesicle	0.143 ± 0.003	0.146 ± 0.002	0.146 ± 0.004	0.152 ± 0.006	0.109 ± 0.012***
LABC	0.269 ± 0.005	0.271 ± 0.005	0.278 ± 0.007	0.278 ± 0.007	0.194 ± 0.013****
Bulbourethral glands	0.025 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.024 ± 0.002	0.022 ± 0.001
Glans Penis	0.021 ± 0.001	0.021 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.018 ± 0.001*

All data are shown as litter means ± SEM. \* (p ≤ 0.05), \*\*\* (p ≤ 0.001), \*\*\*\* (p ≤ 0.0001); ANOVA/ Dunnet. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate. n = number of litters.

**Supplementary Table 2.** Relative weight (%) of non-reproductive organs of adult female and male rats following *in utero* exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac.

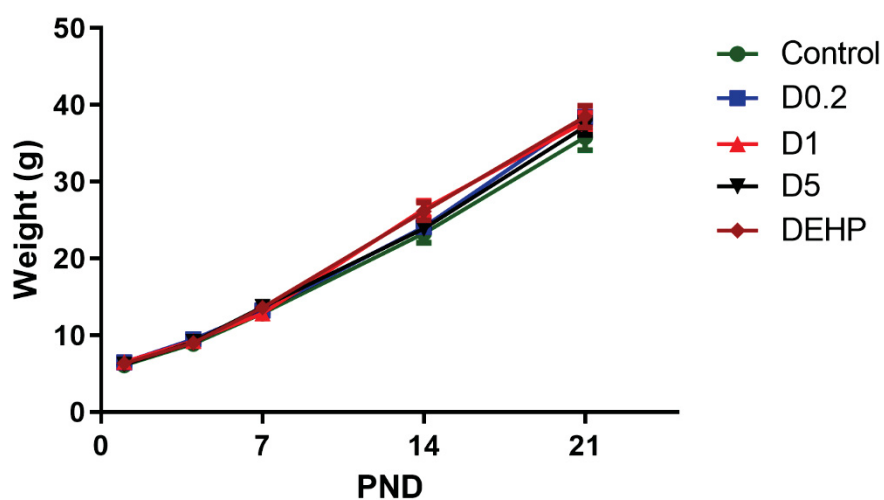
	Experimental Groups				
	Control (n=13)	D0.2 (n=14)	D1 (n=11)	D5 (n=12)	DEHP (n=9)
<b>Female</b>					
<b>Body weight (g)</b>	249 ± 4.039	253 ± 4.669	248 ± 4.043	245 ± 3.159	257 ± 6.134
<b>Liver</b>	3.427 ± 0.090	3.379 ± 0.060	3.534 ± 0.086	3.572 ± 0.082	3.468 ± 0.074
<b>Spleen</b>	0.257 ± 0.004	0.265 ± 0.006	0.272 ± 0.007	0.281 ± 0.009	0.263 ± 0.011
<b>Kidney</b>	0.331 ± 0.008	0.339 ± 0.003	0.335 ± 0.006	0.342 ± 0.003	0.326 ± 0.006
<b>Adrenal gland</b>	0.0144 ± 0.0003	0.0151 ± 0.0004	0.0150 ± 0.0004	0.0146 ± 0.0002	0.0148 ± 0.0005
<b>Male</b>					
<b>Body weight (g)</b>	406 ± 6.722	423 ± 9.003	422 ± 12.25	408 ± 7.089	404 ± 7.089
<b>Liver</b>	3.242 ± 0.031	3.335 ± 0.047	3.229 ± 0.029	3.377 ± 0.058	3.202 ± 0.065
<b>Spleen</b>	0.213 ± 0.004	0.206 ± 0.004	0.209 ± 0.006	0.223 ± 0.011	0.207 ± 0.006
<b>Kidney</b>	0.324 ± 0.005	0.334 ± 0.003	0.328 ± 0.005	0.338 ± 0.004	0.318 ± 0.005
<b>Adrenal gland</b>	0.0075 ± 0.0004	0.0075 ± 0.0004	0.0070 ± 0.0003	0.0066 ± 0.0002	0.0071 ± 0.0002

All data are shown as litter means ± SEM. ANOVA/ Dunnet. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate. n = number of litters

**Supplementary Table 3.** Absolute weight (%) of organs of adult female and male rats following *in utero* exposure to 0.2, 1 and 5 mg/kg/day of diclofenac (D).

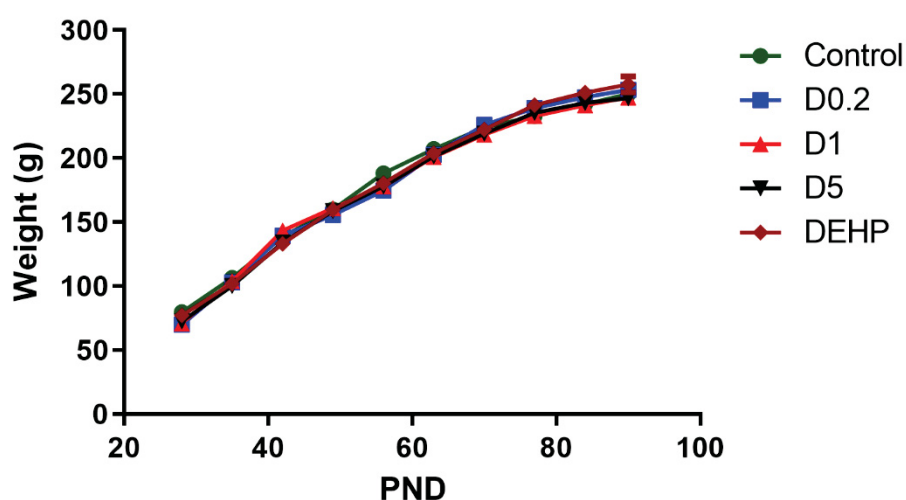
	Experimental Groups				
	Control (n=13)	D0.2 (n=14)	D1 (n=11)	D5 (n=12)	DEHP (n=9)
<b>Female</b>					
<b>Body weight (g)</b>	249 ± 4.039	253 ± 4.669	248 ± 4.043	245 ± 3.159	257 ± 6.134
<b>Liver</b>	8.556 ± 0.302	8.578 ± 0.246	8.788 ± 0.261	8.796 ± 0.277	8.930 ± 0.232
<b>Spleen</b>	0.649 ± 0.015	0.672 ± 0.018	0.676 ± 0.016	0.695 ± 0.023	0.672 ± 0.017
<b>Kidney</b>	0.825 ± 0.023	0.856 ± 0.016	0.832 ± 0.015	0.841 ± 0.009	0.837 ± 0.017
<b>Adrenal gland</b>	0.0357 ± 0.0006	0.0381 ± 0.0010	0.0365 ± 0.0010	0.0363 ± 0.0005	0.0381 ± 0.0010
<b>Male</b>					
<b>Body weight (g)</b>	406 ± 6.722	423 ± 9.003	422 ± 12.25	408 ± 7.089	404 ± 7.089
<b>Liver</b>	13.18 ± 0.264	14.13 ± 0.395	13.68 ± 0.411	13.80 ± 0.306	12.96 ± 0.327
<b>Spleen</b>	0.864 ± 0.013	0.873 ± 0.023	0.884 ± 0.025	0.912 ± 0.048	0.845 ± 0.021
<b>Kidney</b>	1.311 ± 0.024	1.412 ± 0.027	1.389 ± 0.046	1.378 ± 0.023	1.282 ± 0.023
<b>Adrenal gland</b>	0.0303± 0.0014	0.0320 ± 0.0018	0.0285 ± 0.0012	0.0270 ± 0.0007	0.0296 ± 0.0009

All data are shown as litter means ± SEM. ANOVA/ Dunnet. DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate. n = number of litters



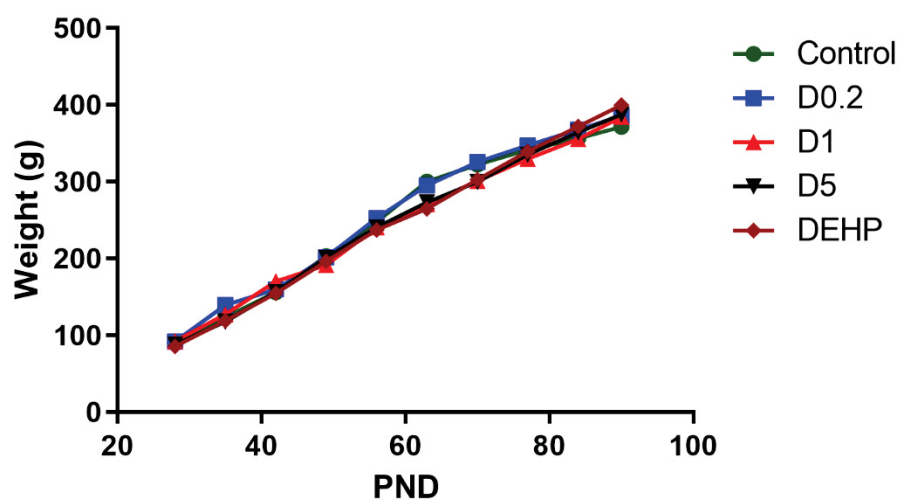
**Supplementary Figure 1.** Body weight development of rat offspring in the weaning period following *in utero* exposure to 0.2, 1 or 5 mg/kg/day of diclofenac (D) and 750 mg/kg/day of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). PND = postnatal day.

All data are shown as litter means  $\pm$  SEM. ANOVA/ Dunnet. n = 9-13 litters/group.



**Supplementary Figure 2.** Body weight development of female offspring in the post-weaning period following *in utero* exposure to 0.2, 1 or 5 mg/kg/day of diclofenac (D), and 750 mg/kg/day of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). PND = postnatal day.

All data are shown as litter means  $\pm$  SEM. ANOVA/ Dunnet. n = 9-13 litters/group.



**Supplementary Figure 3.** Body weight development of male offspring in the post-weaning period following *in utero* exposure to 0.2, 1 or 5 mg/kg/day of diclofenac (D), and 750 mg/kg/day of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). PND = postnatal day.

All data are shown as litter means  $\pm$  SEM. ANOVA/ Dunnet. n = 9-13 litters/group.

## 5.6 References

- Adeyemi, W. J., Omoniyi, J. A., Olayiwola, A., Ibrahim, M., Ogunyemi, O., Olayaki, L. A. 2019. Elevated reproductive toxicity effects of diclofenac after withdrawal: Investigation of the therapeutic role of melatonin. *Toxicology Reports* 6, 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.009>
- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejucq-Rainsford, N., Jégou, B., 2013. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Hum. Reprod.* 28, 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Altman, J., Bayer, S.A., 1978. Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182, 945-971 <https://doi.org/10.1002/cne.901820511>
- Antonucci, R., Zaffanello, M., Puxeddu, E., Porcella, A., Cuzzolin, L., Dolores Pilloni, M., Fanos, V., 2012. Use of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Pregnancy: Impact on the Fetus and Newborn. *Curr. Drug Metab.* 13, 474–490. <https://doi.org/10.2174/138920012800166607>
- ANVISA, 2016 ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Voltaren – Novartis Biociências S.A - Indústria Brasileira, São Paulo – SP
- Arslan, H., Aktaş, A., Elibol, E., Esener, O.B.B., Türkmen, A.P., Yurt, K.K., Onger, M.E., Altunkaynak, B.Z., Kaplan, S., 2016. Effects of prenatal diclofenac sodium exposure on newborn testis: A histomorphometric study. *Biotech. Histochem.* 91, 277–282. <https://doi.org/10.3109/10520295.2016.1151551>
- Axelstad, M., Christiansen, S., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Kortenkamp, A., Hass, U., 2014. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* 147, 489–501. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K.R., Coiffec, I., Rolland, A.D., Chevrier, C., Kristensen, D.M., Lavoué, V., Antignac, J.P., Le Bizec, B.,

- Dejucq-Rainsford, N., Mitchell, R.T., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci. Rep.* 7, 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>
- Birkett, J.W., Lester, J.N., 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes, Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. *Journal of Hazardous Materials.* 100(2003), 317–322 [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00103-1)
- Brown, J.L., Ph, D., Walker, S., Steinman, K., Royal, F., 2004. Endocrine Manual for Reproductive Non-Domestic Species. Smithsonian's Natl. Zool. Park Conserv. Res. Cent. Endocr. Workb.
- Cassina, M., De Santis, M., Cesari, E., van Eijkeren, M., Berkovitch, M., Eleftheriou, G., Raffagnato, F., Di Gianantonio, E., Clementi, M., 2010. First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. *Reprod. Toxicol.* 30, 401–404. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.04.010>
- Cheng, F., Liu, C., Jiang, J., Lu, W., Li, W., Liu, G., Zhou, W.-X., Huang, J., Tang, Y., 2012. Prediction of drug-target interactions and drug repositioning via network-based inference. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002503. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002503>
- Christiansen, S., Axelstad, M., Boberg, J., Vinggaard, A.M., Pedersen, G.A., Hass, U., 2014. Low-dose effects of Bisphenol a on early sexual development in male and female rats. *Reproduction* 147, 477–487. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0377>
- Cunha, L.C., Azeredo, F.S., Mendonça, A.C.V., Vieira, M.S., Pucci, L.L., Valadares, M.C., Freitas, H.O.G., Sena, Â.A.S., Lino, R.D.S., 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Brazilian J. Pharmacogn.* 19, 403-411. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300012>
- Curi, T.Z., Neubert da Silva, G., Passoni, M.T., Lima Tolouei, S.E., Meldola, H., Romano, R.M., Grechi, N., Dalsenter, P.R., Martino-Andrade, A.J., 2019. In Utero and Lactational Exposure to Diisopentyl Phthalate Induces Fetal Toxicity and Antiandrogenic Effects in Rats. *Toxicol. Sci.* 171, 347–358. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz159>

- Dean, A., Mungall, W., McKinnell, C., Sharpe, R.M., 2013. Prostaglandins, Masculinization and Its Disorders: Effects of Fetal Exposure of the Rat to the Cyclooxygenase Inhibitor-Indomethacin. PLoS One. 8, e62556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062556>
- Dean, A., Van Den Driesche, S., Wang, Y., McKinnell, C., Macpherson, S., Eddie, S.L., Kinnell, H., Hurtado-Gonzalez, P., Chambers, T.J., Stevenson, K., Wolfinger, E., Hrabalkova, L., Calarrao, A., Bayne, R. Al, Hagen, C.P., Mitchell, R.T., Anderson, R.A., Sharpe, R.M., 2016. Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. Sci. Rep. 6, 19789. <https://doi.org/10.1038/srep19789>
- EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for veterinary medicinal products – Diclofenac
- Fontenele, E.G.P., Manoel, R.A.M., Quidute, A.R.P., Montenegro, R.M., 2010. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 54(1), 6–16. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302010000100003>
- Gallavan, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L., 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol. 13, 383–390. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(99\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(99)00036-2)
- Gevrek, F., Kara, M., Rağbetli, M.Ç., Aslan, H., 2015. Effects of prenatally exposed diclofenac sodium on rat heart tissue: A stereological and histological study. Turkish J. Med. Sci. 45, 474–480. <https://doi.org/10.3906/sag-1404-173>
- Grande, S.W., Andrade, A.J.M., Talsness, C.E., Grote, K., Chahoud, I., 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate: Effects on female rat reproductive development. Toxicol. Sci. 91, 247–254. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj128>
- Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N.R., Parks, L., 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci. 58, 350–355. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350>



- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the Vagina: Association of Maternal Stilbestrol Therapy with Tumor Appearance in Young Women. *N. Engl. J. Med.* 284, 878–881. <https://doi.org/10.1056/NEJM197104222841604>
- Herbst, A.L., 1976. Summary of the changes in the human female genital tract as a consequence of maternal diethylstilbestrol therapy. *J. Toxicol. Environ. Health* 1, 13–20.
- Holm, J.B., Mazaud-Guittot, S., Danneskiold-Samsøe, N.B., Chalmey, C., Jensen, B., Nørregård, M.M., Hansen, C.H., Styris have, B., Svingen, T., Vinggaard, A.M., Koch, H.M., Bowles, J., Koopman, P., Jégou, B., Kristiansen, K., Kristensen, D.M., 2016. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicol. Sci.* 150, 178–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv332>
- Hughes, I.A., Lim, H.N., Martin, H., Mongan, N.P., Dovey, L., Ahmed, S.F., Hawkins, J.R., 2001. Developmental aspects of androgen action, in: *Molecular and Cellular Endocrinology*. 135, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00622-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00622-0)
- Jarfelt, K., Dalgaard, M., Hass, U., Borch, J., Jacobsen, H., Ladefoged, O., 2005. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod. Toxicol.* 19, 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.11.005>
- Jørgensen, A., Nielsen, J.E., Nielsen, B.F., Morthorst, J.E., Bjerregaard, P., Leffers, H., 2010. Expression of prostaglandin synthases (pgds and pges) during zebrafish gonadal differentiation. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 157, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.014>
- Klopčič, I., Markovič, T., Mlinarič-Raščan, I., Dolenc, M. S. 2018. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicology Letters* 15, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.022>
- Kobayashi, K., Kubota, H., Ohtani, K., Hojo, R., Miyagawa, M., 2012. Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. *J. Toxicol. Sci.* 37, 565–573.

<https://doi.org/10.2131/jts.37.565>

- Kristensen, D.M., Hass, U., Lesn, L., Lottrup, G., Jacobsen, P.R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J.H., Toppari, J., Jensen, T.K., Brunak, S., Skakkebæk, N.E., Nellemann, C., Main, K.M., Jgou, B., Leffers, H., 2011. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum. Reprod.* 26, 235–244. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq323>
- Kristensen, D.M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejucq-Rainsford, N., Leffers, H., Jégou, B., 2012. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int. J. Androl.* 35, 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x>
- Kristensen, D.M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K.M., Jégou, B., 2016. Analgesic use-prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 381–393. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.55>
- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M., 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: Comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533. <https://doi.org/10.1080/01926230290105721>
- Levy, J.R., Faber, K.A., Ayyash, L., Hughes, C.L., 1995. The Effect of Prenatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein on Sexual Differentiation in Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 60–66. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43832>
- Lind, D.V., Main, K.M., Kyhl, H.B., Kristensen, D.M., Toppari, J., Andersen, H.R., Andersen, M.S., Skakkebæk, N.E., Jensen, T.K., 2017. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: A cohort study of 1027 mother-child pairs. *Hum. Reprod.* 32, 223–231. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew285>
- Mazaud-Guittot, S., Nicolaz, C.N., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Maamar, M. Ben, Balaguer, P., Kristensen, D.M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejucq-Rainsford, N., Jégou, B., 2013. Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1757–E1767. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>

- McKenna, L., McIntyre, M., 2006. What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. 56, 636–645 J. Adv. Nurs. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2006.04037.x>
- Motawi, T. K., Ahmed, S. A., El-Boghdady, N. A., Metwally, N. S., Nasr, N. N. 2019. Protective effects of betanin against paracetamol and diclofenac induced neurotoxicity and endocrine disruption in rats. Biomarkers 24, 645-651. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1642958>
- Moore, R.W., Rudy, T.A., Lin, T.M., Ko, K., Peterson, R.E., 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. Environ. Health Perspect. 109, 229–237. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109229>
- Nevill, A.M., 1994. The need to scale for differences in body size and mass: An explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. J. Appl. Physiol. 77, 2870–3. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.6.2870>
- Rebordosa, C., Kogevinas, M., Horváth-Puhó, E., Nørgård, B., Morales, M., Czeizel, A.E., Vilstrup, H., Sørensen, H.T., Olsen, J., 2008. Acetaminophen use during pregnancy: effects on risk for congenital abnormalities. Am. J. Obstet. Gynecol. 198, 178.e1-178.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.08.040>
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. J. Reprod. Fertil. 54, 103–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>
- Ross, A.J., Capel, B., 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. Trends Endocrinol. Metab. 16, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.11.004>
- Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Campón, R., Tresguerres, J.A.F., 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring, in: Toxicology. 205, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.045>
- Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S., Yamasaki, K., 2003. In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed

- ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol. Sci.* 75, 402–411. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg180>
- Scherneck, S., Schöpa, F.L., Entezami, M., Kayser, A., Weber-Schoendorfer, C., Schaefer, C., 2015. Reversible oligohydramnios in the second trimester of pregnancy in two patients with long-term diclofenac exposure. *Reprod. Toxicol.* 58, 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.08.002>
- Sharpe, R.M., 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals, in: *Toxicology Letters.* 120, 221–232. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00298-3)
- Sharpe, R.M., 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.005>
- Siu, K.L., Lee, W.H., 2004. Maternal diclofenac sodium ingestion and severe neonatal pulmonary hypertension. *J. Paediatr. Child Health* 40, 152–153. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2004.00319.x>
- Siu, S.S.N., 2000. A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. *Hum. Reprod.* 15, 2423–2425. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.11.2423>
- Snijder, C.A., Kortenkamp, A., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Hass, U., Burdorf, A., 2012. Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: The Generation R Study. *Hum. Reprod.* 27, 1191–1201. <https://doi.org/10.1093/humrep/der474>
- Thorpe, P.G., Gilboa, S.M., Hernandez-Diaz, S., Lind, J., Cragan, J.D., Briggs, G., Kweder, S., Friedman, J.M., Mitchell, A.A., Honein, M.A., 2013. Medications in the first trimester of pregnancy: Most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 22, 1013–1018. <https://doi.org/10.1002/pds.3495>
- van den Driesche, S., Macdonald, J., Anderson, R.A., Johnston, Z.C., Chetty, T., Smith, L.B., McKinnell, C., Dean, A., Homer, N.Z., Jorgensen, A., Camacho-Moll, M.E., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., 2015. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone

production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci. Transl. Med.* 7, 288ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4097>

Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., Koopman, P., 2005. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.039>

Wolf, C.J., Hotchkiss, A., Ostby, J.S., LeBlanc, G.A., Gray, L.E., 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. *Toxicol. Sci.* 65, 71–86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.1.71>

Yurt, K. K., Kaplan, S. 2018. As a painkiller: a review of pre- and postnatal non-steroidal anti-inflammatory drug exposure effects on the nervous systems. *Inflammopharmacology* 26, 15-28. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0434-0>

## 6 DISCUSSÃO ESTENDIDA E CONCLUSÃO

Nos últimos anos surgiram uma série de estudos associando o uso de analgésicos e AINEs de uso comum, como o paracetamol, ibuprofeno e ácido acetilsalicílico, com distúrbios endócrinos e reprodutivos, principalmente após a exposição pós-natal. Nesses estudos, os autores relatam múltiplas alterações que esses medicamentos poderiam promover como infertilidade, criptorquidismo, hipospádia, insuficiência ovariana prematura em ratos ou, ainda, interferir no desenvolvimento testicular fetal em animais e humanos (KRISTENSEN et al., 2012; SNIJDER et al., 2012; HOLM et al., 2016; BEN MAAMAR et al., 2017; SABIR et al., 2018; LEVERRIER-PENNA et al., 2018; HURTADO-GONZALEZ et al., 2018; STAUSHOLM et al., 2019). A exposição humana aos analgésicos e AINEs pode ocorrer não somente através do uso farmacológico, mas também por meio da água e alimentos contaminados com seus resíduos ou metabólitos, tornando-os um potencial risco à saúde reprodutiva de populações vulneráveis como os indivíduos em idade fértil, gestantes e lactantes (BUSER et al., 1999; STUMPF et al., 1999; REBORDOSA et al., 2008; KRISTENSEN et al., 2011a; PHILIPPAT et al., 2011; SANTOS et al., 2013; THORPE et al., 2013; KIM et al., 2014; EBELE et al., 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos do diclofenaco sobre diferentes parâmetros reprodutivos após exposição durante o período pré-natal de diferenciação sexual em ratos. Foram avaliados parâmetros tipicamente associados à atividade antiandrogênica, peso de órgãos reprodutivos e marcadores do desenvolvimento associados ao início da puberdade em ratos machos e fêmeas. Além disso, também foram coletados dados maternos e gestacionais. O diclofenaco é um AINE amplamente utilizado pela população de modo geral e, apesar de ser contraindicado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres podem utilizá-lo durante esse período. (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2014; ARRAIS et al., 2016; ANVISA 2016). No entanto, os estudos sobre seus possíveis efeitos no sistema reprodutor ainda são limitados e, até então, não há outros trabalhos avaliando parâmetros como distância anogenital, separação prepucial e abertura do canal vaginal, por exemplo, após a exposição pré-natal ao diclofenaco.

As doses selecionadas neste estudo compreendem doses terapeuticamente relevantes que refletem a utilização farmacológica do diclofenaco em seres humanos. Por outro lado, o período de tratamento selecionado, dias gestacional 10 a 20,

compreende os períodos críticos para diferenciação sexual gonadal e fenotípica em ratos, processos que foram alterados pela exposição a outros analgésicos e AINEs, mas que não foram detalhadamente investigados após exposição *in utero* ao diclofenaco. Nesse contexto, o protocolo experimental utilizado não provocou efeitos adversos sobre as progenitoras e o curso da gestação, como evidenciado pela ausência de efeitos sobre o ganho de peso materno durante o tratamento, perdas pós-implante, tamanho das ninhadas, peso ao nascer e viabilidade dos filhotes. A avaliação desses dados gestacionais é importante para a interpretação de dados de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, pois na presença de toxicidade materna há dificuldade para determinar a especificidade de efeitos sobre a prole, que muitas vezes podem ser secundários aos efeitos sistêmicos maternos (US EPA, 1991).

De modo geral, a exposição pré-natal ao diclofenaco não foi capaz de alterar marcadores externos de desregulação endócrina ou o peso dos principais órgãos reprodutores da prole masculina. Além disso, não foram observadas alterações nas funções esteroidogênicas e gametogênicas nos descendentes machos. Alterações nos parâmetros associados à atividade antiandrogênica em machos, já foram correlacionadas a exposição pré-natal à diferentes analgésicos e AINEs de uso comum (KRISTENSEN et al., 2011a; AXELSATD et al., 2014). A distância anogenital (AGD) e o número de mamilos têm sido utilizados como marcadores sensíveis de desregulação da sinalização androgênica *in utero*. Durante o período de diferenciação sexual dependente de hormônios, a ação de andrógenos promove o crescimento do períneo, resultando em uma maior AGD em machos (WELSH et al., 2008). Nesse sentido, a AGD tem sido amplamente utilizada como um marcador de androgenização pré-natal em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DEAN & SHARPE, 2013; SCHWARTZ et al., 2019). Em ratos, a exposição a agentes antiandrogênicos *in utero* resulta na redução da AGD da prole masculina (GRAY et al., 1999; KITA et al., 2016). Da mesma forma, resultados de estudos epidemiológicos demonstraram associações negativas entre exposição materna a desreguladores endócrinos antiandrogênicos e a AGD em recém-nascidos do sexo masculino (SWAN et al., 2005; SWAN et al., 2015). Em roedores, a retenção de mamilos é um outro parâmetro andrógeno-dependente sensível à desregulação endócrina intrauterina. A exposição androgênica *in utero* resulta na regressão de mamilos em ratos machos e a retenção de mamilos ocorre como resultado de insuficiência androgênica pré-natal (VINGGAARD et al., 2005).

Já em 1986, Gupta e Goldman et al., relataram uma redução na AGD em fetos



de camundongos machos após a exposição intrauterina à aspirina ou indometacina. Mais recentemente, a exposição gestacional à anilina (um precursor metabólico do paracetamol) e ao paracetamol também resultou em uma menor AGD na prole masculina (HOLM et al., 2015). Esses dados são corroborados pelos resultados de dois artigos recentes em seres humanos que demonstraram associações entre a exposição gestacional ao paracetamol e redução da AGD em meninos recém-nascidos (FISHER et al., 2016; LIND et al., 2017). Em um estudo com ratos, Axelstad e colaboradores (2014) demonstraram que a exposição *in utero* e lactacional a 350 mg/kg/dia de paracetamol resultou num aumento significativo do número de mamilos nos filhotes machos. Além disso, a exposição gestacional a analgésicos e AINEs tem sido associada a alterações de longo prazo, como infertilidade, baixa contagem de espermatozoides e alterações na morfologia testicular na vida adulta (HOLM et al., 2016; ARSLAN et al., 2016; ROSSITTO et al., 2018). Acredita-se que os analgésicos induzam esses e outros distúrbios reprodutivos por meio de múltiplos mecanismos, como por exemplo pela inibição de prostaglandinas. De acordo com Kristensen et al. (2011b), muitos dos compostos desreguladores endócrinos que reduzem a masculinização em estudos com animais, são potentes inibidores da síntese de prostaglandinas. Além da inibição de prostaglandinas, a ativação do sistema endocanabinoide, envolvido em diferentes processos reprodutivos em ambos os sexos (GALIÈGUE et al., 1995; SCHMID et al., 1997; SCHUEL et al., 2002; GYE et al., 2005; TAYLOR et al., 2007; MECCARIELLO et al., 2014), e a interferência direta com a expressão de enzimas esteroidogênicas (HAN et al., 2010; TINWELL et al., 2013; HOLM et al., 2015), também têm sido propostos como possíveis mecanismos.

Da mesma forma que em machos, a desregulação endócrina em fêmeas pode ocasionar múltiplos distúrbios endócrinos e reprodutivos. Nesse estudo, não foram observadas alterações na AGD e no desenvolvimento de mamilos nas fêmeas expostas *in utero* ao diclofenaco. Dados sobre esses parâmetros avaliados após a exposição pré-natal de fêmeas a analgésicos e AINEs são escassos, porém, no estudo de Holm et al. (2016), foi observada uma redução significativa na AGD em fêmeas expostas *in utero* ao paracetamol e seu precursor metabólico anilina, sugerindo um possível efeito anti-androgênico. Além disso, alterações semelhantes já foram associadas à exposição intrauterina a substâncias androgênicas (WOLF et al., 2002) e estrogênicas (LEVY et al., 1995; KOBAYASHI et al., 2012; CHRISTIANSEN et al., 2014). No presente estudo, a ausência de efeitos sobre a AGD, o número de



mamilos e o peso de órgãos reprodutivos em fêmeas, indica ausência de efeitos hormonais diretos sobre órgãos e tecidos responsivos a sinais hormonais na prole feminina. Contudo, efeitos indiretos sobre componentes do sistema endócrino e reprodutivo não podem ser totalmente descartados.

Em relação aos marcos do desenvolvimento associados ao início da puberdade avaliados nesse estudo, um possível atraso foi observado na prole masculina e feminina. Embora resultados significativos só tenham sido observados para a separação prepucial na dose mais baixa de diclofenaco, é possível observar, na análise estatística, que as curvas de sobrevivência foram deslocadas para direita em todos os grupos, tanto para machos quanto para fêmeas. É importante ressaltar que esses possíveis efeitos foram encontrados em doses terapeuticamente relevantes, mais baixas do que normalmente se encontra nos demais estudos com analgésicos e outras substâncias como os ftalatos (SALAZAR et al., 2004; GRANDE et al., 2006), conhecidos por seus efeitos desreguladores endócrinos. Além disso, os resultados obtidos para essas análises não foram acompanhados de alterações no peso corporal, indicando que os efeitos observados nos marcos do início da puberdade não refletem uma menor taxa geral de crescimento dos animais. Uma correlação negativa entre o peso no PND 35 e o dia da separação prepucial foi observado nos animais controle em Yoshimura et al. (2005), demonstrando uma tendência de machos com maior peso completarem a separação prepucial mais cedo.

A puberdade é controlada pelo eixo gonadal hipotalâmico-hipofisário (HPG) e é iniciada pelo surgimento da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em um momento reprodutivo apropriado. No entanto, o eixo HPG é ativo muito mais cedo, estendendo-se ao desenvolvimento fetal para algumas espécies. Por exemplo, em humanos, um aumento na secreção de gonadotrofina é observado no meio da gestação (KAPLAN et al., 1976; CLEMENTS et al., 1976; HERBISON, 2016). Não está claro se esse processo de desenvolvimento também ocorre em roedores, pois ainda não foram feitas tentativas para medir as gonadotrofinas em embriões. Porém, sabe-se que em ratos o período de desenvolvimento pré-natal das estruturas hipotalâmicas e, principalmente, a diferenciação celular ocorre entre os dias gestacionais 13 e 18 (ALTMAN E BAYER, 1978), período que, em parte, coincide com a exposição *in utero* ao diclofenaco no presente estudo.

Vários estudos sugeriram citotoxicidade induzida por diclofenaco no sistema nervoso e acredita-se que os efeitos pré-natais do medicamento sejam capazes de

levar a alterações pós-natais (GEVREK et al. 2015; KHOSHVAKHTI et al. 2015; ARSLAN et al. 2016; YURT E KAPLAN 2018; MOTAWI et al., 2019). Além disso, em um estudo recente, a exposição ao diclofenaco promoveu uma supressão significativa de GnRH, aumento significativo na secreção de prolactina e redução nas atividades enzimáticas de catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD) (YURT E KAPLAN et al., 2018). Existem relatos na literatura sobre os efeitos do diclofenaco no sistema nervoso central e periférico. A administração crônica do medicamento promove estresse oxidativo e, portanto, a produção de radicais livres, que poderiam atravessar a barreira hematoencefálica e causar disfunção na secreção hipotalâmica do GnRH (INOUE et al., 2004; ALABI et al., 2017; ADEYEMI et al., 2019). Alguns estudos epidemiológicos também revelaram que o estresse oxidativo é considerado um fator importante na perturbação do sistema endócrino, podendo alterar as características e funções gerais das células da glândula tireoide (ASSMAA et al. 2012), causar danos nas células Leydig dos testículos e interferir no processo de espermatogênese, por exemplo (GUILOSKI et al. 2015). Portanto, sabendo que a exposição ao diclofenaco tem sido associada ao estresse oxidativo, neurotoxicidade e a alterações no eixo HPG, é possível levantar a hipótese de que o atraso observado nos marcos do desenvolvimento nesse estudo possa estar relacionado a um desbalanço nos sistemas de sinalização hipotalâmicos relacionados ao início da puberdade.

Levando-se em consideração os dados apresentados, foi possível concluir que o diclofenaco, administrado em doses terapeuticamente relevantes a ratas prenhes, não induziu toxicidade materna e também não foi capaz de alterar parâmetros sensíveis a alterações hormonais na prole como a distância anogenital, o número de mamilos e o peso dos principais órgãos reprodutivos de machos e fêmeas expostos *in utero*. Além disso, não foram observadas alterações na contagem espermática diária ou na histologia dos testículos da prole masculina. Em contraste com esses achados negativos, foi observado um possível atraso nos parâmetros associados ao início da puberdade, tanto para machos, quanto para fêmeas. Apesar do uso comum do diclofenaco pela população de modo geral, ainda existem poucos estudos e com dados limitados acerca de seus efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento e, estudos futuros devem investigar outros efeitos da exposição pré-natal à esse fármaco para sua avaliação como possível desregulador endócrino.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABOU NADER, N.; BOYER, A. Updating the function of Activin A in the fetal testis: a new role in steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 161, n. 7, p. bqaa072, May 2020.
- ADEYEMI, W. J.; OMONIYI, J. A.; OLAYIWOLA, A.; et al. Elevated reproductive toxicity effects of diclofenac after withdrawal: Investigation of the therapeutic role of melatonin. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 571-577, Jun 2019.
- ALABI, Q. K.; AKOMOLAFE, R. O.; OLUKIRAN, O. S.; et al. The Garcinia kola biflavonoid kolaviron attenuates experimental hepatotoxicity induced by diclofenac. **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p 284-290, Dec 2017.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 182, n. 5, p. 945-971, Dec, 1978.
- ALTMAN, R.; BOSCH, B.; BRUNE, K.; PATRIGNANI, P.; YOUNG, C. Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. **Drugs**, v. 75, n. 8, p. 859-877, May 2015.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; TORRES, N. H.; et al. Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n.3, p. 1809- 4457, Jun 2017.
- ANDERSEN, J. T. et al. Diclofenac/misoprostol during early pregnancy and the risk of miscarriage: a Danish nationwide cohort study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 294, n. 2, p. 245-50, Aug 2016.
- ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXÉUS, N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, v. 50, n. 10, p. 1319-1330, Mar 2003.

ANTONUCCI, R.; ZAFFANELLO, M.; PUXEDDU, E.; et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. **Current Drug Metabolism**, v.13, n. 4, p. 474-490(17), May 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n. 41, de 16 de setembro de 2011 - Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências**. IMPRENSA/ANVISA, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Voltaren – Novartis Biociências S.A.** Indústria Brasileira, São Paulo – SP, 2016.

ARRAIS, P. S. et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. **Revista de Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 13s, Dec 2016.

ARSLAN, H.; AKTAŞ, A.; ELIBOL, E.; et al. Effects of prenatal diclofenac sodium exposure on newborn testis: A histomorphometric study. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 91, n. 4, p. 277-82, Feb 2016.

AUSTRALIAN GOVERNMENT – DEPARTMENT OF HEALTH. Safety review of diclofenac. **Therapeutic Goods Administration**, 2014.

AXELSTAD, M. et al. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. **Reproduction**, v. 147, n. 4, p. 489-501, 2014.

BAKKER, M. K.; KÖLLING, P.; VAN DEN BERG, P. B.; DE WALLE, H. E. K.; DE JONG VAN DEN BERG, L. T. W. Increase in use of selective serotonin reuptake inhibitors in pregnancy during the last decade, a population-based cohort study from the Netherlands. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 600-606, Apr 2008.

BAUER, S. R.; FORTNER, R. T.; GATES, M. A.; et al. Analgesic use in relation to sex hormone and prolactin concentrations in premenopausal women. **Cancer Causes and**

**Control**, v. 24, n. 6, p. 1087-1097, Mar 2013.

BEN MAAMAR, M. et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 44184, Mar 2017.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Quimica Nova**, v.30, n. 3, p. 651-666, Jun 2007.

BIRKETT, J. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 100 (2003), p. 317–322, Jun 2003.

BLACK, R. A; HILL, D.A. Over-the-counter medications in pregnancy. **American Family Physician**, v. 67, n. 12, p. 2517-2524, Jun 2003.

BRUNE, K.; FURST, D. E. Combining enzyme specificity and tissue selectivity of cyclooxygenase inhibitors: Towards better tolerability? **Rheumatology**, v. 46, n. 6, p. 911-919, Jun 2007.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 8, p. 2391-2399, Aug 2004.

BRUNE, K.; RENNER, B.; HINZ, B. Using pharmacokinetic principles to optimize pain therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 10, p. 589-598, Sep 2010.

BRUNE, K; RENNER, B; TIEGS, G. Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. **European Journal of Pain**, v. 19, n. 7, p. 953–965, Sep 2014.

BUERGE, I. J.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D.; BUSER, H. R. Combined sewer overflows to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 13, p. 4096-4102, May 2006.

BUSER, H. R.et al. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. **Environmental**

**Science and Technology**, v. 33, n. 15, p. 2529-2535, 1999.

CALAFAT, A. M.; YE, X.; WONG, L. Y.; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. L. Exposure of the U.S. population to Bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 1, p. 1-147, Jan 2008.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. **Annual Review of Physiology**, v. 73, n. 1, p. 135–62, Mar 2011.  
CHRISTIANSEN, S.; AXELSTAD, M.; BOBERG, J.; et al. Low-dose effects of Bisphenol a on early sexual development in male and female rats. **Reproduction**, v. 147, n. 4, p. 477–487, 2014.

CLEMENTS, J. A.; REYES, F. I.; WINTER, J. S. D.; FAIMAN, C. Studies on human sexual development. III. fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of LH, CG, and FSH. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 42, n. 1, p. 9-19, Jan 1976.

COSTA, D. B.; COELHO, H. L. L.; SANTOS, D. B. DOS. Utilização de medicamentos antes e durante a gestação: prevalência e fatores associados. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. e00126215 Mar 2017.

COURTIER, A.; CADIÈRE, A.; ROIG, B. Human pharmaceuticals: Why and how to reduce their presence in the environment. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 15, n.1, p. 77-82, Feb 2019.

CSABA, G. Immunity and longevity. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 1-17, Mar 2019.

DAL PIZZOL, T. DA S.; FONTANELLA, A. T.; CARDOSO FERREIRA, M. B.; et al. Analgesic use among the Brazilian population: Results from the national survey on access, use and promotion of rational use of medicines (PNAUM). **PLoS ONE**, v.14, n. 3, p. e0214329, Mar 2019.

DAVIES, N. M.; ANDERSEN, K. E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac.

Therapeutic insights and pitfalls. **Clinical Pharmacokinetics**, v.33, 184-213, Oct 1997.

DAW, J. R.; HANLEY, G. E.; GREYSON, D. L.; MORGAN, S. G. Prescription drug use during pregnancy in developed countries: A systematic review. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 20, n. 9, p. 895-902, Sep 2011.

DEAN, A.; SHARPE, R. M. Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: Relationship to male reproductive development and its disorders. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 6, p. 2230-8, Jun 2013.

DEPUE, R. H.; PIKE, M. C.; HENDERSON, B. E. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 71, n. 6, p. 1151–1155, Dec 1983.

DI, S.; DIAO, J.; WANG, XIANGYUN; et al. Bioaccumulation of dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) in carp in a water/sediment microcosm: important role of sediment particulate matter and bioturbation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 9500-9507, Feb 2019.

DI, S.; LIU, R.; TIAN, Z.; et al. Assessment of tissue-specific accumulation, elimination and toxic effects of dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) in carp through aquatic food web. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2288, May 2017.

EBELE, A. J. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v.3, n.1, p. 1-16, Mar 2017.

EC, European Commission. **Commission Implementing Regulation (EU) N° 321/2011 of 1 April 2011 amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles Text with EEA relevance** UNION, O. J. O. T. E. Official Journal of the European Union: Commission Implementing Regulation (EU) 2011.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, Feb 2006.

FERNÁNDEZ, MANUEL; FERNÁNDEZ, MÓNICA; LACA, AMANDA; LACA, ADRIANA; DÍAZ, M. Seasonal occurrence and removal of pharmaceutical products in municipal wastewaters. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n.1, p. 495-502, Mar 2014.

FERNANDEZ, M. F.; OLMOS, B.; GRANADA, A.; et al. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: A nested case-control study. **Environmental Health Perspectives**, v.115, Sup. 1, p. 7-136, Dec 2007.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. **Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar. Gestação e Analgesia**. Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Complementar. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Jan, 2011.

FISHER, B. G. et al. Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. **Human Reproduction**, v. 31, n. 11, p. 2642-2650, Nov 2016.

FONSECA, M. R. C. C. DA; FONSECA, E. DA; BERGSTEN-MENDES, G. Prevalência do uso de medicamentos na gravidez: uma abordagem farmacoepidemiológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 205-212, Apr 2002.

FONTENELE, E. G. P.; MANOEL, R. A. M.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, Fev 2010.

FORTNER, R. T.; OH, H.; DAUGHERTY, S. E.; et al. Analgesic Use and Patterns of Estrogen Metabolism in Premenopausal Women. **Hormones and Cancer**, v. 5, n. 2, p. 104-112, Dec 2014.



FOWLER, P. D.; DAWES, P. T.; JOHN, V. A.; SHOTTON, P. A. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its hydroxylated metabolites during once-daily administration of a 100 mg slow-release formulation. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 468-472, Jul 1986.

FOWLER, P. D.; SHADFORTH, M. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. **European journal of clinical**, v. 25, n. 3, p. 389-394, May 1983.

GALIÈGUE, S.; MARY, S.; MARCHAND, J.; et al. Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 54-61, Aug 1995.

GEVREK, F.; KARA, M.; RAĞBETLİ, M. Ç.; ASLAN, H. Effects of prenatally exposed diclofenac sodium on rat heart tissue: A stereological and histological study. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 474-480, Jul 2015.

GILL, W. B.; SCHUMACHER, G. F. B.; BIBBO, M. Pathological semen and anatomical abnormalities of the genital tract in human male subjects exposed to diethylstilbestrol in utero. **Journal of Urology**, v. 117, n. 4, April, p. 477-480, Apr 1977.

GLOVER, D. D.; AMONKAR, M.; RYBECK, B. F.; TRACY, T. S. Prescription, over-the-counter, and herbal medicine use in a rural, obstetric population. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 188, p.1039-1045, Apr 2003.

GODFRAY, H. C. J.; STEPHENS, A. E. A.; JEPSON, P. D.; et al. A restatement of the natural science evidence base on the effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1897, p. 20182416, Feb 2019.

GRANDE, S. W.; ANDRADE, A. J. M.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; CHAHOUD, I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate: Effects on female rat reproductive development. **Toxicological**

**Sciences**, v. 91, n. 1, p. 247–254, Feb 2006.

GRAY, L. E.; OSTBY, J.; MONOSSON, E.; KELCE, W. R. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1-2, p. 48-64, Jan 1999.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. São Paulo: McGraw Hill Brasil, p. 988, 2012.

GUILLETTE, L. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 32-43, Jan 1996.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PEREIRA, L. DA S.; NEVES, A. P. P.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 204-211, Aug 2015.

GUPTA, C. The role of prostaglandins in masculine differentiation: Modulation of prostaglandin levels in the differentiating genital tract of the fetal mouse. **Endocrinology**, v. 124, n. 1,1. P. 129-133, Jan 1989.

GUPTA, C.; GOLDMAN, A. S. The arachidonic acid cascade is involved in the masculinizing action of testosterone on embryonic external genitalia in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4346-4349, Feb 1986.

GYE, M. C.; KANG, H. H.; KANG, H. J. Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. **Archives of Andrology**, v. 51, n. 3, p. 247-55, 2005 May-Jun 2005.

HAN, S. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia*

magna and *Moina macrocopa*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 256-64, Jul 2010.

HANNON, P. R.; FLAWS, J. A. The effects of phthalates on the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 8, Feb 2015.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5-17, May 2002.

HENRY, A.; CROWTHER, C. Patterns of medication use during and prior to pregnancy: The MAP study. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 40, n. 2, p. 165-172, May 2000.

HERBISON, A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 452-466, May 2016.

HERBST, A. L. Summary of the changes in the human female genital tract as a consequence of maternal diethylstilbestrol therapy. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 1, p. 13-20, Dec 1976.

HERBST, A. L.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D. C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **N Engl J Med**, v. 284, n. 15, p. 878-81, Apr 1971.

HINDMAN, A. R.; MO, X. M.; HELBER, H. L.; et al. Varying susceptibility of the female mammary gland to in utero windows of bpa exposure. **Endocrinology**, v. 158, n. 10, p. 3435-3447, Jul 2017.

HOLM, J. B. et al. Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. **Toxicological Sciences**, v. 148, n. 1, p. 288-98, Nov 2015.

HOLM, J. B.; MAZAUD-GUITTOT, S.; DANNESKIOLD-SAMSØE, N. B.; et al. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive

Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. **Toxicological Sciences**, v. 150, n. 1, p. 178–189, Mar 2016.

HU, G.; LI, J.; SHAN, Y.; et al. In utero combined di-(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate exposure cumulatively impairs rat fetal Leydig cell development. **Toxicology**, v. 395, n. 1, p. 23-33, Feb 2018.

HURTADO-GONZALEZ, P.; ANDERSON, R. A.; MACDONALD, J.; et al. Effects of exposure to Acetaminophen and Ibuprofen on fetal germ cell development in both sexes in rodent and human using multiple experimental systems. **Environmental Health Perspectives**, v.126, n. 4, p. 0047006, Apr 2018.

INOUE, A.; MURANAKA, S.; FUJITA, H.; et al. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: Dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome c, and caspase pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1290-1299, Oct 2004.

JENSEN, M. S. et al. Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. **Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 779-85, Nov 2010.

JÚNIOR, J. O. L.; SERRANO, S. C.; TEODORO, A. L.; DANA, B. A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar**. v. 51, n. 9, p.173-8, 2007.

KAPLAN, S. L.; GRUMBACH, M. M.; AUBERT, M. L. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 32, p. 161-234, 1976.

KAWAGUCHI, R.; MATSUMOTO, K.; AKIRA, S.; et al. Guidelines for office gynecology in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists (JAOG) 2017 edition. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 45, n. 4, p. 766-786, Jan 2019.

KHOSHVAKHTI, H.; YURT, K. K.; ALTUNKAYNAK, B. Z.; et al. Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney: A stereological and histopathological study. **Renal Failure**, v. 37, n. 8, p. 1379-1383, Sep 2015.

KIM, H. J. et al. Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 6, p. 973-8, 2014.

KITA, D. H.; MEYER, K. B.; VENTURELLI, A. C.; et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. **Toxicology**, v. 368-369, n.1, p. 152-161, Aug 2016.

KOBAYASHI, K.; KUBOTA, H.; OHTANI, K.; HOJO, R.; MIYAGAWA, M. Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 565–573, Mar 2012.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, Mar 2002.

KRISTENSEN, D. M. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. **Hum Reprod**, v. 26, n. 1, p. 235-44, Jan 2011a.

KRISTENSEN, D. M. et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. **Int J Androl**, v. 35, n. 3, p. 377-84, Jun 2012.

KRISTENSEN, D. M.; MAZAUD-GUITTOT, S.; GAUDRIAULT, P.; et al. Analgesic use-prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n.1, p. 381–393, May 2016.

KRISTENSEN, D. M.; SKALKAM, M. L.; AUDOUZE, K.; et al. Many putative endocrine disruptors inhibit prostaglandin synthesis. **Environmental Health Perspectives**, v.119, n.4, p. 156-A182, Apr 2011b.

LEE, H. B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1-2, p. 122-129, Nov 2005.

LEVERRIER-PENNA, S.; MITCHELL, R. T.; BECKER, E.; et al. Ibuprofen is deleterious for the development of first trimester human fetal ovary ex vivo. **Human Reproduction**, v. 33, n. 3, p. 482-493, Mar 2018.

LEVY, J. R.; FABER, K. A.; AYYASH, L.; HUGHES, C. L. The Effect of Prenatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein on Sexual Differentiation in Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, n. 1, p. 60–66, Jan 1995.

LIND, J. N.; TINKER, S. C.; BROUSSARD, C. S.; et al. Maternal medication and herbal use and risk for hypospadias: Data from the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 22, n. 7, 783-793, Jul 2013.

LIND, D. V. et al. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. **Human Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 223-231, Jan 2017.

LONAPPAN, L.; BRAR, S. K.; DAS, R. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, n. 1, p. 127-138, Nov 2016.

LOPES, V. S. A.; RIENTE, R. R.; DA SILVA, A. A.; et al. Development of a solid-phase extraction system modified for preconcentration of emerging contaminants in large sample volumes from rivers of the lagoon system in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 20, n. 1, p. 572-577, Sep 2016.

LUPATTELLI, A.; SPIGSET, O.; TWIGG, M. J.; et al. Medication use in pregnancy: A cross-sectional, multinational web-based study. **BMJ Open**, v. 4, n. 2, p. e004365, Jan 2014.

MA, L.; MO, J.; CHEN, Y.; LI, L.; XIE, L.; CHEN, X.; LI, X.; WANG, Y.; LIN, Z.; GE, R. – S. In utero cadmium and dibutyl phthalate combination exposure worsens the defects of fetal testis in rats. **Environmental Pollution**, v. 265, n. 1, p. 114842, May 2020.

MAZAUD-GUITTOT, S. et al. Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 11, p. E1757-67, Nov 2013.

MECCARIELLO, R.; BATTISTA, N.; BRADSHAW, H. B.; WANG, H. Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 412354, 2014.

MEYBOOM, R. H. B.; HEYMEIJER, G. W. J.; VAN DEN BEMT, P. M. L. A.; DE KONING, G. H. P. Disturbance of menstruation as a side-effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 4, n. 3, p. 161-163, May 1995.

MOTAWI, T. K.; AHMED, S. A.; EL-BOGHDADY, N. A.; METWALLY, N. S.; NASR, N. N. Protective effects of betanin against paracetamol and diclofenac induced neurotoxicity and endocrine disruption in rats. **Biomarkers**, v. 24, n. 7, p. 645-651, Mar 2019.

NESAN, D.; KURRASCH, D. M. Gestational Exposure to Common Endocrine Disrupting Chemicals and Their Impact on Neurodevelopment and Behavior. **Annual Review of Physiology**, v. 82, n. 1, p. 177- 202, Nov 2019.

NITSCHKE, J. F.; PATIL, A. S.; LANGMAN, L. J.; et al. Transplacental Passage of Acetaminophen in Term Pregnancy. **American Journal of Perinatology**, v. 34, n. 6, p. 541-543, Sep 2017.

PAGÉ-LARIVIÈRE, F.; TREMBLAY, A.; CAMPAGNA, C.; RODRIGUEZ, M. J.; SIRARD, M. A. Low concentrations of bromodichloromethane induce a toxicogenomic response in porcine embryos in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 44-44, Sep 2016.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548-549, n. 1, p. 148-154, Apr 2016.

PEREIRA, M. R. F.; ALEIXO, J. F.; CAVALCANTI, L. DE F.; et al. Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? **Reproductive Toxicology**, v. 93, n.1, p. 68- 74, Apr 2020.

PHILIPPAT, C. et al. Analgesics during pregnancy and undescended testis. **Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 747-9, Sep 2011.

RATHMELL, J. P.; VISCOMI, C. M.; ASHBURN, M. A. Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. **Anesth Analg**, v. 85, n. 5, p. 1074-87, Nov 1997.

REBORDOSA, C. et al. Pre-natal exposure to paracetamol and risk of wheezing and asthma in children: a birth cohort study. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 583-90, Jun 2008.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 398-428, Jan 2018.

RIESS, W.; STIERLIN, H.; DEGEN, P.; et al. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent voltaren. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.7, Sup. 22, p.17-27, Jul 1978.

ROBERTS, E.; NUNES, V. D.; BUCKNER, S.; et al. Paracetamol: Not as safe as we thought? A systematic literature review of observational studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 3, p. 552-559, Jan 2016.



ROCHESTER, J. R.; BOLDEN, A. L.; KWIATKOWSKI, C. F. Prenatal exposure to bisphenol A and hyperactivity in children: a systematic review and meta-analysis. **Environment International**, v. 114, n.1, p. 343-356, Dec 2017.

RODPRASERT, W.; MAIN, K. M.; TOPPARI, J.; VIRTANEN, H. E. Associations between male reproductive health and exposure to endocrine-disrupting chemicals. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 7, p. 49–61, Jun 2019.

ROSSITTO, M.; MARCHIVE, C.; PRUVOST, A.; et al. Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. **FASEB Journal**, v. 33, n. 1, p. 1-1522, Jan 2018.

ROSS, P. S.; DE SWART, R. L.; REIJNDERS, P. J. H.; et al. Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 2, p. 162-7, Feb 1995.

SABIR, S.; AKHTAR, M. F.; SALEEM, A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n.1, p. 1277-1286, Nov 2018.

SALAZAR, V.; CASTILLO, C.; ARIZNAVARRETA, C.; CAMPÓN, R.; TRESGUERRES, J. A. F. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology. Anais...* v. 205, p.131–137, Aug 2004.

SANTOS, L. H. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, n. 1, p. 302-16, Sep 2013.

SAWAKI, M. et al. Evaluation of an in utero through lactational exposure protocol for detection of estrogenic effects of ethinyl estradiol on the offspring of rats: preliminary trial. **Reprod Toxicol**, v. 17, n. 3, p. 335-43, 2003 May-Jun 2003.

SCHERNECK, S. et al. Reversible oligohydramnios in the second trimester of pregnancy in two patients with long-term diclofenac exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 61-4, Dec 2015.

SCHMID, P. C.; PARIA, B. C.; KREBSBACH, R. J.; SCHMID, H. H. O.; DEY, S. K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 4188-4192, Apr 1997.

SCHUEL, H.; BURKMAN, L. J.; LIPPES, J.; et al. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. Chemistry and Physics of Lipids. **Anais...**, v.121, n. 1-1, p. 211-227, Aug 2002.

SCHWARTZ, C. L.; CHRISTIANSEN, S.; VINGGAARD, A. M.; et al. Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 253-272, Feb 2019.

SEPPÄLÄ, E.; NISSILÄ, M.; ISOMÄKI, H.; et al. Comparison of the effects of different anti-inflammatory drugs on synovial fluid prostanoid concentrations in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 4, n.3, p. 315-320, Sep 1985.

SATHYANARAYANA, S.; KARR, C. J.; LOZANO, P.; et al. Baby care products: Possible sources of infant phthalate exposure. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. e260-8, Feb 2008.

SIROIS, J.; SAYASITH, K.; BROWN, K. A.; et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: A 2004 account. **Human Reproduction Update**, v. 10, n.5, p. 373-385, Sep 2004.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. **Human Reproduction**, v.16, n. 5, p. 972–978, May 2001.

SNIJDER, C. A.; KORTENKAMP, A.; STEEGERS, E. A. P.; et al. Intrauterine exposure

to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: The Generation R Study. **Human Reproduction**, v.27, n. 4, p. 1191-201, Apr 2012.

STAUSHOLM, R.; ERNSTSEN, C.; MAZUAD-GUITTOD, S.; KRISTENSEN, D. M. Intrauterine exposure to drugs and reproduction—still reasons for concern! **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 7, p. 62-67, Aug 2019.

STÜLTEN, D.; ZÜHLKE, S.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. **Science of the Total Environment**, v. 405, n. 1-3, p. 310-316, Nov 2008.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135-41, Jan 1999.

SWAN, S. H. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: Long-term effects in humans. **APMIS**, v. 108, n. 12, p. 793-804, Dec 2000.

SWAN, S. H.; MAIN, K. M.; LIU, F.; et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1056-61, Aug 2005.

SWAN, S. H.; SATHYANARAYANA, S.; BARRETT, E. S.; et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. **Human Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 963-72, Feb 2015.

TADEVOSYAN, N. S.; POGHOSYAN, S. B.; KHACHATRYAN, B. G.; et al. Residues of xenobiotics in the environment and phytotoxic activity in Armenia. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 54, n. 10, p. 1011-1018, Aug 2019.

THORPE, P. G. et al. Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. **Pharmacoepidemiology and**

**Drug Safety**, v. 22, n. 9, p. 1013-8, Sep 2013.

TINWELL, H. et al. The screening of everyday life chemicals in validated assays targeting the pituitary-gonadal axis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 184-96, Jul 2013.

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy appears in *Drugs*. **Drugs**, v. 34, p. 244–285, Nov 1988.

TOPPARI, J. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental and Health Perspectives**, v. 104 Suppl 4, p. 741-803, Aug 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). EPA-600-FR-91-001: **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**. Washington, 1991.

US EPA, United States Environmental Protection Agency. EPA/630/R-96/012: **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis**. Washington, 1997.

VASCONCELLOS, P. R. O; RIZZOTO, M. L. F; MACHINESKI, G. G; COSTA, R. M. Pesticide exposure conditions on Parkinson's disease patients followed at a neurology clinic of a university hospital and perception of the relationship of exposure with illness. **Saúde Debate - Rio de Janeiro**, v. 43, n. 123, p. 1084-1094, Oct 2019.

VERAS, T. B.; LUIZ RIBEIRO DE PAIVA, A.; DUARTE, M. M. M. B.; NAPOLEÃO, D. C.; DA SILVA PEREIRA CABRAL, J. J. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, n.1, p. 961-969, May 2019.

VERPLANCK, P. L.; TAYLOR, H. E.; NORDSTROM, D. K.; BARBER, L. B. Aqueous stability of gadolinium in surface waters receiving sewage treatment plant effluent Boulder Creek, Colorado. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 18. P. 6923-6929, Aug 2005.

VINGGAARD, A. M.; CHRISTIANSEN, S.; LAIER, P.; et al. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 886-97, Mar 2005.

VOM SAAL, F. S. et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. **Toxicol Ind Health**, v. 14, n. 1-2, p. 239-60, 1998 Jan-Apr 1998.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: A human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, n. 1-2, p. 2-9, Dec 2005.

WARNER, T. D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.13, p. 7563-7568, Jun 1999.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1479-90, Apr 2008.

WENG, J.-C.; HONG, C. I.; TASI, J.-D.; SHEN, C.-Y.; SU, P.-H.; WANG, S.-L. The association between prenatal endocrine-disrupting chemical exposure and altered resting-state brain fMRI in teenagers. **Brain Structure and Function**, v. 225, n. 1, p.1669–1684, May 2020.

WERLER, M. M. et al. Use of over-the-counter medications during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n. 3 Pt 1, p. 771-7, Sep 2005.

WHO, World Health Organization. **State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals**. 2012.

WHO-IPCS, World Health Organization – International Programme on Chemical Safety. **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**.

Geneva, Switzerland. 2002.

WIEGAND, U. W.; CHOU, R. C.; MAULIK, D.; LEVY, G. Assessment of biotransformation during transfer of propoxyhene and acetaminophen across the isolated perfused human placenta. **Pediatric Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 145-153, Dec 1984.

WOLF, C. J.; HOTCHKISS, A.; OSTBY, J. S.; LEBLANC, G. A.; GRAY, L. E. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 71–86, Sep 2002.

YAMADA, K.; KIMURA, T.; IKEHARA, S.; et al. Pain medications during pregnancy: data from the Japan environment and children's study. **Journal of Anesthesia**, v. 34, n.1, p.202-210, Apr 2020.

YE, X.; KUKLENYIK, Z.; BISHOP, A. M.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 844, n.1, p. 53-59, Nov 2006.

YOSHIMURA, S.; YAMAGUCHI, H.; KONNO, K.; et al. Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 18, n. 3, p. 141–157, Jul 2005.

YURT, K. K.; KAPLAN, S. As a painkiller: a review of pre- and postnatal non-steroidal anti-inflammatory drug exposure effects on the nervous systems. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 15-28, Dec 2018.